

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

Immunhistochemische, glykohistochemische und
ultrastrukturelle Untersuchungen am Ovar der Katze
(*Felis catus*)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Franziska Katharina Margit Herla

aus Bamberg

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 12.07.2014

Meinen Eltern und Michael Rauch

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Anatomie des Ovars der Katze	2
1.1.	Makroskopische Anatomie.....	2
1.2.	Embryologie	3
1.3.	Oogenese	3
1.4.	Mikroskopische Anatomie	4
1.4.1.	Ovargewebe.....	4
1.4.2.	Rete ovarii	4
1.4.3.	Keimdrüsenepithel	5
1.4.4.	Thekadrüsen	6
1.5.	Follikulogenese	7
1.5.1.	Primordialfollikel	7
1.5.2.	Primärfollikel	8
1.5.3.	Sekundärfollikel	9
1.5.4.	Tertiärfollikel	10
1.5.5.	Zona pellucida	11
1.5.6.	Ovulation.....	13
1.6.	Gelbkörper.....	14
1.7.	Polyoozytäre Follikel	16
1.8.	Follikelatresie	17
1.9.	Ovarreserve	19
1.10.	Zyklus der Hauskatzen	19
2.	Lektine.....	21
2.1.	Geschichte der Lektine.....	21
2.2.	Bindungseigenschaften	21
2.3.	Bindungsstellen der Lektine im Ovar	23
3.	Immunhistochemie	24
3.1.	Zytoskelett.....	24
3.1.1.	Mikrofilamente.....	24
3.1.2.	Mikrotubuli	25
3.1.3.	Intermediärfilamente	25

3.1.3.1.	Zytokeratine	27
3.1.3.2.	Vimentin.....	27
3.1.3.3.	Synemin / Desmin	28
3.2.	Laminin	29
3.3.	Connexin	30
3.4.	S 100.....	31
3.5.	Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren	32
III.	MATERIAL UND METHODEN	33
1.	Untersuchungsmaterial.....	33
2.	Materialvorbereitung für die Lichtmikroskopie.....	33
2.1.	Probennahme.....	33
2.2.	Fixierung	33
2.2.1.	Bouin	33
2.2.2.	Formol	33
2.3.	Einbetten	34
2.4.	Schneiden	34
2.5.	Färbungen.....	34
2.5.1.	HE-Färbung.....	34
2.5.2.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) nach McManus.....	35
2.5.3.	Trichromfärbung nach Masson und Goldner (Goldner-Färbung):.....	36
2.5.4.	Alcianblau 8GX-Färbung (Alcianblau-Färbung):bei pH-Wert 2,5 und bei pH-Wert 1,0	36
2.5.5.	van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung.....	37
2.6.	Lektine.....	37
2.6.1.	FITC-markierte Lektine	38
2.6.2.	Biotinylierte Lektine	39
2.7.	Immunhistochemie	40
3.	Elektronenmikroskopie	43
IV.	ERGEBNISSE	45
1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	45
1.1.	Konventionelle Färbungen	45
1.1.1.	Ovargewebe.....	46
1.1.1.1.	Thekadrüsen	47

1.1.1.2.	Gelbkörper.....	49
1.1.1.3.	Keimdrüsenepithel und Tunica albuginea.....	51
1.1.1.4.	Rete ovarii	53
1.1.2.	Funktionsgebilde auf dem Ovar	55
1.1.2.1.	Primordialfollikel	55
1.1.2.2.	Primärfollikel	56
1.1.2.3.	Sekundärfollikel	58
1.1.2.4.	Tertiärfollikel	60
1.1.2.5.	Polyoozytäre Follikel	63
1.1.2.6.	Atretische Follikel	64
1.2.	Glykohistochemische Untersuchungen.....	67
1.2.1.	Concanavalin A (Con A).....	69
1.2.2.	Wheat germ Agglutinin (WGA).....	72
1.2.3.	Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs)	74
1.2.4.	Pisum sativum Agglutinin (PSA).....	76
1.2.5.	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHAE).....	79
1.2.6.	Viscum album Agglutinin (VAA).....	81
1.2.7.	Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	82
1.2.8.	GSA I, MAA I, RCA, SJA, PHA L	84
1.3.	Immunhistochemische Untersuchungen	85
1.3.1.	Pancytokeratin.....	85
1.3.2.	Vimentin.....	88
1.3.3.	Laminin	91
1.3.4.	Desmin	94
1.3.5.	Synemin.....	97
1.3.6.	Tubulin	100
1.3.7.	SMA	103
1.3.8.	S100.....	107
1.3.9.	Connexin 43	111
1.3.10.	Progesteron-Rezeptor	114
1.3.11.	Östrogen-Rezeptor (ER α)	117
2.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	120
2.1.	Ultrastruktur der Primordial- und der Primärfollikel	120
2.2.	Ultrastruktur antraler Follikel.....	130

2.3.	Keimdrüsenepithel	137
2.4.	Ultrastruktur der Thekadrüsen	139
V.	DISKUSSION	145
1.1.	Primordialfollikel	145
1.2.	Primärfollikel	148
1.3.	Sekundärfollikel	150
1.4.	Tertiärfollikel	153
1.5.	Zona pellucida	156
1.6.	Atretische Follikel	158
1.7.	Gelbkörper	160
1.8.	Rete ovarii	163
1.9.	Thekadrüsen	164
1.10.	Keimdrüsenepithel	166
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	168
VII.	SUMMARY	171
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	173
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	189
X.	TABELLENVERZEICHNIS	194
XI.	ANHANG	195
1.	Methodik - Lichtmikroskopie	195
1.1.	Fixierungslösungen	195
1.2.	Puffer	195
1.3.	Färbelösungen	196
1.3.1.	H.E.	196
1.3.2.	PAS	196
1.3.3.	Goldner	197
1.3.4.	Alzianblau	197
1.3.5.	Glykohistochemie	198
1.3.6.	Immunhistochemie	198
2.	Methodik - Elektronenmikroskopie	199
2.1.	Fixierungslösung nach Karnovsky	199

2.2.	Cacodylat-Puffer	199
2.3.	Lösungen	200
2.4.	Methylenblau nach Richardson	200
2.5.	Polyembed-Einbettung	201
XII.	DANKSAGUNG	202

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
aF	atretischer Follikel
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
Aufl.	Auflage
BG	Blutgefäß
BGW	Bindegewebe
biot.	biotinyliert
BSM	Basalmembran
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CK	Zytokeratin
CO	Cumulus oophorus
Con A	Concanavalin Agglutinin
CP	Zytoplasma
CR	Corona radiata
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
EM	Elektronenmikroskopie
ER α	Estrogen receptor alpha
et al.	et alii, et aliae
e.V.	eingetragener Verein
evtl.	eventuell
EZ	Eizelle
F	Follikel
FE	Follikelepithel
Fh	Follikelhöhle
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
Fuc	Fukose
GA	Golgi-Apparat

Gal	Galaktose
GH	Growth Hormon
GK	Gelbkörper
GL	Granulosaluteinzellen
Glc	Glukose
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GR	Granula
GSA I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I
GSA II	Griffonia simplicifolia Agglutinin II
GZ	Granulosazellen
HE	Hämatoxylin-Eosin
IF	Intermediärfilamente
IGF-I	Insulin-like growth factor I
IZ	Interstitielle Zellen
KDE	Keimdrüsenepithel
Konz.	Konzentration
LH	Luteinisierendes Hormon
Lig.	Ligamentum
Lnn.	Lymphonodi
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
Lu	Lumen
MAA I	Maackia amurensis Agglutinin I
Man	Mannose
MI	Mitochondrien
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
NAcGal	N-acetyl-Galaktosamin
NAcGlc	N-acetyl-Glukosamin
NAcNeu	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
NC	Nukleolus
NK	Nukleus
Oo	Ooplasma
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
p.c.	post conceptum

PGE	Prostaglandin E
PGF	Prostaglandin F
PHAE	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHAL	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
p.n.	post natum
PNA	Peanut Agglutinin
Proc.	Processus
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin
SB	scale bar
SBA	Soybean Agglutinin
SJA	Sophora japonica Agglutinin
SMA	Smooth muscle actin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
sog.	so genannte
TA	Tunica albuginea
TD	Thekadrüse
Te	Theca externa
Ti	Theca interna
TL	Thekaluteinzellen
TZ	Thekazellen
UDA	Urtica dioica Agglutinin
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
V.	Vena
VAA	Viscum album Agglutinin
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkern
ZP	Zona pellucida
z.T.	zum Teil

I. EINLEITUNG

Die Katze (*Felis catus*) erfreut sich in Deutschland zunehmender Beliebtheit. Die Zahl der in deutschen Haushalten gehaltenen Katzen hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Während im Jahr 1999 6,5 Millionen Katzen gehalten wurden, waren es 2011 schon 8,2 Millionen (Industrieverband Heimtierbedarf e.V.). Damit ist die Hauskatze in Deutschland das beliebteste Haustier und wird auch in den zahlreichen Tierarztpraxen und Tierkliniken sehr oft vorstellig.

Das Reproduktionsverhalten der bei uns am häufigsten vorkommenden Europäisch-Kurzhaarkatze läuft in der Regel sehr effektiv ab. Die Rolligkeit tritt in der „Saison“ alle zwei bis drei Wochen auf und eine Katze kann bis zu drei Würfe im Jahr haben, mit im Schnitt etwa vier Welpen (BUSCH et al. 2009). Daher werden die meisten der weiblichen Tiere im Alter von sechs bis sieben Monaten, vor Eintritt der Geschlechtsreife, ovarieektomiert.

Im Rahmen einer routinemäßigen Kastration kann ausreichend Material für eine histologische Untersuchung zur Verfügung gestellt werden. In meiner Arbeit wurden nicht nur juvenile Eierstöcke sondern auch aktive Ovarien älterer Tiere mit verschiedenen Funktionsgebilden untersucht.

Es liegen bereits mehrere Studien älteren Datums zur Morphologie der Ovarien der Hauskatze vor. Allerdings gibt es keine umfangreiche Studie neueren Datums über das gesamte funktionelle Ovargewebe. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit lichtmikroskopische, ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunhistochemische Methoden angewandt, um eine detaillierte funktionelle Beschreibung der Mikromorphologie des Katzenovars zu erstellen. Diese sollen frühere Untersuchungen durch den Einsatz neuer histologischer und histochemischer Methoden ergänzen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Anatomie des Ovars der Katze

1.1. Makroskopische Anatomie

Die Hauptaufgabe des Ovars, als keimbereitendes Organ ist die Reifung und Bereitstellung sprungreifer Follikel; daneben ist es auch als inkretorische Drüse für die Produktion der weiblichen Geschlechtshormone zuständig (SINOWATZ & HEES 2012).

Die Ovarien der Katze sind makroskopisch betrachtet von längsovaler oder kugeliger Gestalt, bei einer Länge von ca. 8-9mm. Ihre Oberfläche ist kleinhöckrig bis glatt und sie sind von derber Konsistenz (FREWEIN & VOLLMERSHAUS 1994; NICKEL et al. 2004). Topographisch gesehen befinden sich die paarigen Ovarien kaudal der Nieren, hochdorsal in der Lendengegend unter dem dritten bis vierten Lendenwirbel. Bei der Katze findet während der Embryonalentwicklung kein Descensus ovarii statt (FREWEIN & VOLLMERSHAUS 1994; KÖNIG & LIEBICH 2011). Durch seine Aufhängung, das Mesovarium, treten entsprechend Blut- und Lymphgefäße am Margo mesovaricus bzw. Hilus ovarii in das Organ ein. Der gegenüberliegende Rand wird als Margo liber bezeichnet. In direkter Nähe zur Extremitas tubaria liegt der Anfangsteil des Eileiters, wohingegen an der Extremitas uterina durch das Lig. ovarii proprium eine Verbindung zur gleichseitigen Uterushornspitze besteht (NICKEL et al. 2004).

Bei makroskopischer Betrachtung des Anschnitts kann eine Rindenzone (Zona parenchymatosa) von einer etwas lockereren Markzone (Zona vasculosa) unterschieden werden (NICKEL et al. 2004).

Die Blutversorgung erfolgt über die A. ovarica aus der Aorta abdominalis, die mehrere Äste zur Versorgung des Ovars entlässt. Die entsprechende Vene zieht zur V. cava caudalis. Der Lymphabfluss erfolgt über die Lnn. iliaci mediales, sowie über die Lnn. lumbales aortici. Die vegetative Innervation des Ovars erfolgt durch den Plexus ovaricus des Truncus sympathicus und den N. vagus (NICKEL et al. 2004).

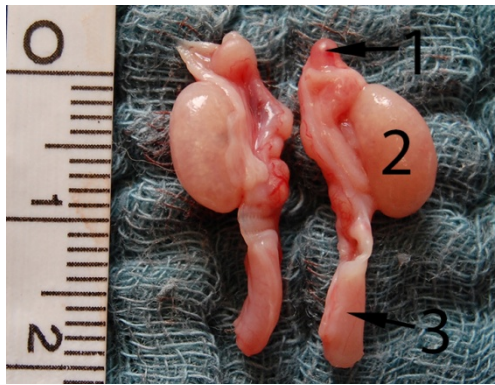


Bild 1: Ovarien einer Katze nach Entnahme durch Ovariektomie

Auf dem linken und rechten Ovar (2) sind makroskopisch keine Funktionsgebilde erkennbar, da es sich um ein juveniles Tier handelt. Es sind auch Anteile des Eileiters (1) und des Uterus (3) durch das Lig. ovarii proprium und das Mesovar verbunden.

1.2. Embryologie

Die ersten Primordialkeimzellen lassen sich zuerst im Dottersack des Embryos nachweisen. Dort sind sie am Ende der dritten Entwicklungswoche gut erkennbar. Anschließend wandern sie über den Enddarm, das Mesenterium und den Urnierenbereich in die noch undifferenzierte Keimleiste ein. Bereits während der Wanderung teilen sich die Keimzellen und vermehren sich so. Nach Ankunft der Primordialkeimzellen in den Keimleisten entwickeln sich diese entsprechend ihrer chromosomalen Ausstattung bei den zwei X-Chromosomen der weiblichen Katzen zum Ovar. In der folgenden Vermehrungsperiode, die bei der Katze bis kurz nach der Geburt dauert, steigt die Zahl der Primordialkeimzellen deutlich. Mit dem Eintritt der Keimzellen in die Prophase der Meiose I endet die Vermehrungsphase und die Oogonien werden zu Oozyten, die in Form eines Primordialfollikels in ein Ruhestadium unterschiedlich langer Dauer eintreten (KINGSBURY 1913-1914; AMSELGRUBER 1983; RÜSSE & SINOWATZ 2010). Die ursprünglichen Keimstränge, aus denen die Urkeimleisten bestehen degenerieren und werden im Mark zu Marksträngen (ULFIG 2009).

1.3. Oogenese

Die Oogenese bezeichnet die gesamte Entwicklung der weiblichen Keimzellen. Die ersten Primordialkeimzellen sind in der Dottersackwand nachweisbar. Nach dem Einwandern in die Keimleiste und einigen morphologischen Veränderungen, wie dem Verlust ihrer amöboiden Zellform und der Aufhellung des Zytoplasmas, werden sie als Oogonien bezeichnet. Durch mitotische Teilungen der Oogonien liegen diese am Ende der Vermehrungsperiode in Keimballen oder Keimsträngen vor, die untereinander durch Interzellularbrücken verbunden sind. Diese

Verbindung gewährleistet den Austausch von Zellorganellen oder Wachstumsfaktoren und ermöglicht eine Synchronisation der Keimzellentwicklung. Bei der Katze erfolgt die Umwandlung der Oogonien in Oozyten durch Eintritt in die Prophase der Meiose I vom 40-50. Tag p.c., bis zum 8. Tag p.n.. Die Oozyten bilden mit umgebenden, flachen Follikelzellen die Primordialfollikel in der Ovarrinde und werden nach einem unterschiedlich langen Ruhestadium aktiviert (AMSELGRUBER 1983). Auf genauere Ausführung der Embryonalentwicklung und Oogenese wird verzichtet, da diese Arbeit sich ausschließlich mit präpubertären und adulten Ovarien beschäftigt.

1.4. Mikroskopische Anatomie

1.4.1. Ovargewebe

Die Zona vasculosa bzw. das Mark des Ovars besteht vorwiegend aus lockerem Bindegewebe in das Blutgefäße, Lymphgefäße sowie vegetative Nervenfasern eingelagert sind, welche über den Hilus in das Organ eindringen. Auch das Rete ovarii befindet sich bei der Katze dort (NICKEL et al. 2004; SINOWATZ & HEES 2012).

Die Zona parenchymatosa bzw. die Rinde des Ovars besteht aus spinozellulärem Bindegewebe, welches besonders zellreich ist und zahlreiche, dort eingelagerte Follikel verschiedener Entwicklungsstadien, Thekadrüsen sowie Gelbkörper beinhaltet (NICKEL et al. 2004; SINOWATZ & HEES 2012). Die Stromazellen weisen eine hohe Regenerationsfähigkeit auf und sind daher an den reparativen Umbauvorgängen, die im Ovar ständig stattfinden, beteiligt (LIEBICH 2010).

1.4.2. Rete ovarii

Das Rete ovarii besteht aus tubulären und netzartigen Strukturen, die von einem isoprismatischen Epithel ausgekleidet sind. Es wurde früher angenommen, dass es Einfluss auf die Follikelreifung sowie auf die Transformation von Oogonien zu Oozyten während der embryonalen Entwicklung und auf die Induktion der Meiose haben könnte (WILKERSON 1923; AMSELGRUBER 1983; GELBERG et al. 1984). Das Rete ovarii hat seinen Ursprung im Mesonephros und ist embryonal am deutlichsten entwickelt. Im adulten Ovar ist es meist nur rudimentär ausgebildet (WILKERSON 1923; WENZEL & OLDEND'HAL 1985; BRISTOL-

GOULD & WOODRUFF 2006; RÜSSE & SINOWATZ 2010). Bei der Katze ist es im Vergleich zu anderen Säugetieren eher im Mark zu finden als am Hilus (WILKERSON 1923). Es können drei verschiedene Teile unterschieden werden, das intraovarielle Rete, das extraovarielle Rete und das „konnektive“ Rete, welches die beiden anderen miteinander verbindet. Das intraovarielle Rete befindet sich in der Markzone des Ovars und wird von einem einschichtigen, isoprismatischen Epithel ausgekleidet (BYSKOV 1975; BYSKOV et al. 1977; GELBERG et al. 1984; BRISTOL-GOULD & WOODRUFF 2006). An der Extremitas tubaria geht es in das konnektive Rete über; das Lumen erweitert sich und das Epithel wird hochprismatisch und zeigt einen ziliären Besatz. Das extraovarielle Rete, dessen Zellen ein kleineres Kern-Zytoplasma-Verhältnis haben, setzt sich in dem periovariellen Gewebe fort und endet dort blind. Sowohl im extraovariellen, als auch im konnektiven Rete sind PAS positive Substanzen in den Zellen und im Lumen nachweisbar (GELBERG et al. 1984). Die Funktionen des Rete im adulten Ovar sind vielfältig; zum einen ist es sekretorisch aktiv, zum anderen wird vermutet, dass die Granulosazellen wachsender Follikel in engem Kontakt mit dem intraovariellen oder konnektiven Rete stehen oder sogar von diesen abstammen könnten. Sie teilen sich eine Basalmembran und sind sich morphologisch sehr ähnlich. Es stehen sogar von den Zellen des Rete entlassene Zytoplasmafortsätze in Kontakt mit den Keimzellen. Daher wurde angenommen, dass das Rete auch essentiell für die Follikulogenese im adulten Ovar sein könnte (BYSKOV et al. 1977; GELBERG et al. 1984; WENZEL & OLDEND'HAL 1985).

1.4.3. Keimdrüsenepithel

Das Ovar ist von einem einschichtigen Epithel umgeben, dem sog. Keimdrüsenepithel, welches sich meist als isoprismatisches Epithel darstellt und sich in dem Peritonealepithel der Bauchhöhle am Margo mesovaricus fortsetzt (FREWEIN & VOLLMERSHAUS 1994). Seine Höhe ist je nach Zyklusstadium und Lokalisation platt bis kubisch (BJERSING & CAJANDER 1975; GURAYA 1979). Oberhalb der präovulatischen Follikel nimmt die Anzahl an Lysosomen im Keimdrüsenepithel deutlich zu. Direkt vor dem Eisprung verschwinden diese wieder und das im apikalen Teil des sprungreifen Follikels liegende Gewebe wird aufgesplittet. Postovulatorisch proliferiert das Keimdrüsenepithel und schließt den durch die Follikelruptur entstandenen Defekt. Die Funktionen des

Keimdrüsenepithels werden von den darunterliegenden Stromazellen moduliert (BJERSING & CAJANDER 1975; VIGNE et al. 1994). Bei immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis von Zuckerstrukturen wurde festgestellt, dass im Oberflächenepithel die gleichen spezifischen Zuckerstrukturen nachweisbar sind, die sich auch in dem von der Eizelle gebildeten Anteil der Zona pellucida wachsender Follikel nachweisen lassen (SKINNER & DUNBAR 1992). Unter dem Keimdrüsenepithel befindet sich die Tunica albuginea, eine ca. 100µm dicke (LIEBICH 2010), bindegewebige, gefäßarme Kapsel aus vorwiegend kollagenen Fasern und Bindegewebe (GURAYA 1979; SINOWATZ & HEES 2012).

1.4.4. Thekadrüsen

Eine weitere Struktur, die sehr ausgeprägt im Katzenovar anzutreffen ist, sind die interstitiellen Zellen oder Thekadrüsen, die morphologisch sehr den Luteinzellen ähneln und bei Katzen jeden Alters auftreten. Dabei handelt es sich um ein gut vaskularisiertes, in Form einer endokrinen Drüse aufgebautes Gewebe, welches sowohl im Mark, als auch in der Rinde zu finden ist (GURAYA 1979 & 1981). Diese entstehen aus der Theca interna atretischer Follikel, durch Hypertrophie und Einlagern weiterer Zellen aus den umliegenden Thekadrüsen. Allerdings findet dies erst im adulten, endokrin aktiven Ovar statt. Auch im fetalen und neonatalen Katzenovar sind bereits interstitielle Zellen zu finden, die ihren Ursprung im Mark haben (KINGSBURY 1913-1914; GURAYA 1979; PÉREZ et al. 1999). In den interstitiellen Zellen ist eine für Steroidhormon-synthetisierende Zellen typische Zellorganellenausstattung zu finden, die der Morphologie der Luteinzellen im Gelbkörper ähnelt (KONECNY 1959; NESCI & MOTTA 1970). Die Zellen der Thekadrüsen sind im Vergleich zu den umliegenden Stromazellen deutlich größer und haben eine runde bzw. regelmäßige Zellform mit viel Zytoplasma und einem kleinen Nukleus, der ein oder zwei Nukleoli enthält (NESCI & MOTTA 1970). Die drei vorherrschenden Zellorganellen oder Zellbestandteile sind zahlreiche Lipidtropfen, Mitochondrien und glattes endoplasmatisches Retikulum. Diese stehen sowohl morphologisch, als auch funktionell miteinander in Verbindung, um die endokrine Funktion der interstitiellen Zellen zu gewährleisten (NESCI & MOTTA 1970; GURAYA 1981). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen fiel auch der Reichtum an glattem endoplasmatischem Retikulum auf, das in konzentrischen Windungen um die Mitochondrien und Lipidtropfen

angeordnet ist (MOTTA et al. 1975). Die in großer Zahl vorhandenen Lipidtropfen enthalten in normalen interstitiellen Zellen vor allem Phospholipide. Bei degenerierenden Thekadrüsen in den medullären Regionen sind daneben auch Cholesterol und seine Ester, Triglyceride und Pigmente in den Lipidtropfen zu finden (GURAYA 1981). Aufgrund der Morphologie der Zellen, die in Form einer endokrinen Drüse angeordnet sind, mit zahlreichen Kapillarplexen in direktem Zellkontakt sowie der Verteilung der Zellorganellen und der Inhaltstoffe der Lipidtropfen, als auch dem Vorhandensein verschiedener Enzyme, lässt sich auf deren Funktion zur Synthese und Speicherung von Steroidhormonen schließen (GURAYA & GREENWALD 1964; SAIDAPUR 1978; GURAYA 1981).

1.5. Follikulogenese

Die Follikel im Ovar bestehen in der Regel aus einer Eizelle und deren Hüllzellen, den Follikelepithelzellen. Die Entwicklung der Oozyte wird maßgeblich von den auch als Granulosazellen bezeichneten Follikelepithelzellen beeinflusst. Die zwischen Eizelle und Follikelepithel ausgebildeten „gapjunctions“ ermöglichen den Austausch von Signalmolekülen und nutritiven Stoffen (BUCCIONE et al. 1990; JEWGENOW 1996; SINOWATZ & HEES 2012). Bei den im Ovar befindlichen Follikeln können drei verschiedene Zustandsformen unterschieden werden: das Ruhestadium, die Wachstumsphase oder die Atresie (PEDERSEN & PETERS 1968; BRISTOL-GOULD & WOODRUFF 2006). Die Gruppe der wachsenden Follikel bildet im Laufe ihrer Entwicklung die verschiedenen Follikelstadien oder Funktionsgebilde, wobei sich über 90% der im Ovar vorliegenden Follikel in einem präantralen Stadium befinden (CARRIJO et al. 2010).

1.5.1. Primordialfollikel

Im Cortex befindet sich direkt unterhalb der Tunica albuginea meist eine große Ansammlung ruhender Primordialfollikel (GURAYA 1979). Diese 20-40 µm großen Follikel besitzen ein einschichtiges, flaches, undifferenziertes Follikelepithel, welches die Eizelle umgibt (CARRIJO et al. 2010). Die Oozyte beinhaltet einen großen, runden, exzentrischen, heterochromatinarmen Kern mit einem oder zwei Kernkörperchen. Zwischen dem Oolemm und dem Follikelepithel sind auch einige „gapjunctions“ zu finden. Der Follikel wird durch eine dünne Basallamina zum umgebenden Gewebe abgegrenzt. Die Zellorganellen sind

homogen im gesamten Ooplasma verteilt. In diesem Stadium sind nur wenige Golgi-Komplexe im Zytoplasma zu finden und das raue endoplasmatische Retikulum ist nur schwach ausgebildet. Die häufigsten Zellorganellen sind runde Mitochondrien vom Crista-Typ, die in zwei verschiedenen Formen auftreten können. Einerseits mit geringer Elektronendichte und wenigen Cristae oder mit hoher Elektronendichte und vielen Cristae (CARRIJO et al. 2010). Außerdem werden vorwiegend Mitochondrien, die eine runde Form aufweisen gefunden. Nur selten sind dazwischen elongierte Exemplare zu finden. Auch vereinzelte Lipidtropfen und membrangebundene Vakuolen, die entweder zur Aufbewahrung oder zum Transport von exogenem- oder endogenem Material dienen, befinden sich im Zytoplasma (GURAYA 1979; KORFSMEIER 1983; JEWENGENOW & STOLTE 1996; CARRIJO et al. 2010). Die Granulosazellen sind flach, haben einen großen Nukleus und relativ wenig Zellorganellen (CARRIJO et al. 2010).

1.5.2. Primärfollikel

Durch Aktivierung eines ruhenden Primordialfollikel und Eintritt in die Wachstumsphase entsteht aus diesem ein Primärfollikel. Dieser zeichnet sich durch Zunahme des Ooplasmas gegenüber dem Primordialfollikel aus. Auch die Zahl der die Eizelle umgebenden Granulosazellen nimmt zu und es bildet sich ein isoprismatisches, einschichtiges Follikelepithel (GURAYA 1979; JEWENGENOW & STOLTE 1996). Der Follikeldurchmesser beträgt 30-60 µm. Zwischen den Follikelzellen und der Eizelle lässt sich bereits lichtmikroskopisch eine dünne, homogen wirkende Schicht von Zona pellucida Material erkennen. In diese ragen die Mikrovilli der Oozyte sowie die Ausstülpungen der Follikelepithelzellen (GURAYA 1979; JEWENGENOW & STOLTE 1996; CARRIJO et al. 2010; SINOWATZ & HEES 2012). Auch die Zellorganellen vermehren sich und freie Ribosomen, Vesikel unterschiedlicher Größe und Mitochondrien vom Crista-Typ sind gleichmäßig im Ooplasma verteilt. Weiterhin sind vorwiegend runde Mitochondrien zu finden, dazwischen aber auch einige längliche Exemplare. Das endoplasmatische Retikulum ist konzentrisch angeordnet und auch der Golgi-Apparat ist gut ausgebildet (JEWENGENOW & STOLTE 1996; CARRIJO et al. 2010). Die Granulosazellen sind kubisch und haben einen runden Zellkern, runde und längliche Mitochondrien und sowohl raues, als auch glattes endoplasmatisches Retikulum ist zu erkennen (CARRIJO et al. 2010). Die Lage der Primärfollikel im Ovar ist meist am Übergang zwischen

der Rinde mit den Ansammlungen an Primordialfollikeln und den deutlich ausgeprägten interstitiellen Drüsen (GURAYA 1979).

1.5.3. Sekundärfollikel

Durch die mitotische Teilung der Follikelzellen entsteht ein Sekundärfollikel, mit einem mehrschichtigen iso- bis hochprismatischen Follikelepithel. Dieser wächst in der pääntralen Phase auf 50-110µm (CARRIJO et al. 2010). Bei beginnender Antrumbildung kann er bis zu 200µm erreichen (SINOWATZ & HEES 2012) und ist eher in der medullären Region des Eierstocks zu finden (GURAYA 1979). Zwischen der Eizelle und dem mehrschichtigen Follikelepithel, auch perivitelliner Spalt genannt, ist nun deutlich die Zona pellucida, eine feinfibrilläre, glykoproteinreiche Schicht zu erkennen (LIEBICH 2010; SINOWATZ & HEES 2012). Der Hauptbestandteil der Zona pellucida sind vier Glykoproteine, weshalb die Zona pellucida histochemisch durch die PAS-Reaktion gut darzustellen ist. Bei der Befruchtung verhindert sie eine Polyspermie und kann jeweils nur von artspezifischen Spermien durchdrungen werden (SINOWATZ et al. 2001; BRAUN et al. 2009; LIEBICH 2010; GUPTA et al. 2012). Die Zona pellucida setzt sich auch häufig in Bereiche zwischen zwei Granulosazellen fort. Sie wird von Seite der Oozyte durch zahlreiche Mikrovilli durchbrochen, von Seite der Granulosazellen ebenfalls durch unzählige Projektionen, die „gapjunctions“ bilden und so eine direkte Verbindung des Zytoplasmas der Eizelle mit dem Zytoplasma der Oozyte bilden (CARRIJO et al. 2010). Der Zellkern ist groß und rund und beinhaltet einen fibrogranulären Nukleolus. Im Zytoplasma nehmen die Zellorganellen weiter zu. Vorwiegend sind runde, aber auch einige längliche Mitochondrien, sowie reichlich endoplasmatisches Retikulum und Ribosomen zu finden. Die Zisternen des Golgi-Apparates erweitern sich und die Vesikel aus diesem wandern in die Peripherie der Eizelle, wo sie sich später als corticale Granula unter dem Oolemm anordnen (CARRIJO et al. 2010; RÜSSE & SINOWATZ 2010). Diese so genannte corticale Granula ist deutlich ab dem Stadium des Sekundärfollikels zu finden. Dabei handelt es sich um sekretorische, Membran-begrenzte Organellen, die spezielle Enzyme und Glykoproteine enthalten. Es wurde vermutet, dass diese kurz vor der Ovulation in den perivitellinen Raum freigesetzt wurden, um die physikalische und chemische Struktur der Zona pellucida zu verändern und so auch ihren Beitrag zum Polyspermie-Block leisten (GULYAS 1980). Bei vielen

Säugetieren wurde präovulatorisch eine cortikale-Granula-freie Zone oberhalb der meiotischen Chromosomen gefunden, die diese Theorie der Exozytose der cortikalen Granula bestätigt. Allerdings existiert bei der Katze keine entsprechende Granula-freie Zone und auch die These, dass eine kontinuierliche, gleichförmig im Zytoplasma verteilte cortikale Granula ein Zeichen von Unreife der entsprechenden Eizelle ist, wurde von Byers widerlegt (GULYAS 1980; BYERS et al. 1992). Im Ooplasma erscheinen auch Lipidtropfen in kleineren Anzahlen und die Zellorganellen und organisieren sich zu Konglomeraten (CARRIJO et al. 2010). Die zahlreichen Mikrovilli der Oozyte führen zu einer deutlichen Oberflächenvergrößerung der Eizelle und ermöglichen zum anderen die Verbindung mit Ausläufern der Granulosazellen, zur Ernährung der Oozyte. Die Granulosazellen sind ähnlich wie in den Primärfollikeln kubisch, mit einem runden Nukleus und zahlreichen Zellorganellen. Alle Follikel dieses Stadiums sind von einer Basalmembran umgeben, die sie gegen das Ovarialstroma abgrenzt (CARRIJO et al. 2010).

1.5.4. Tertiärfollikel

Durch mitotische Teilung vermehren sich die Granulosazellen weiter und die Spalträume in dem mehrschichtigen Follikelepithel erweitern sich und füllen sich mit klarer hyaluronsäure- und eiweißhaltiger Flüssigkeit, welche von den Follikelzellen sezerniert wird (GURAYA 1979; LIEBICH 2010). Wenn sich ein einheitlicher Hohlraum, das so genannte Antrum folliculi gebildet hat, wird der Follikel als Tertiärfollikel oder auch als antraler Follikel angesprochen (SINOWATZ & HEES 2012). Exzentrisch an der Wand angelagert liegt die Eizelle in einem Zellhaufen, dem Cumulus oophorus, der in die Follikelhöhle ragt. In diesem Stadium differenzieren sich die Granulosazellen weiter und es können Basalzellen, Intermediärzellen und als innerste Schicht die Zellen der Corona radiata unterschieden werden (GURAYA 1979). Bei letzterer handelt es sich um hochprismatische Epithelzellen, welche der Zona pellucida außen anliegen (LIEBICH 2010). Durch die radiäre Ausrichtung dieser Zellen zur Eizelle entsteht der Eindruck eines strahlenkranzähnlichen Gebildes (SINOWATZ & HEES 2012). Auch morphologisch unterscheiden sich Follikelepithelzellen in unterschiedlichen Positionen zur Eizelle (KOHATA et al. 2007). Die von den Corona radiata Zellen entlassenen Zytoplasmafortsätze durchdringen die äußere grobporige Schicht der Zona pellucida und verbinden sich über Desmosomen und

Nexus mit den Mikrovilli der Eizelle, die die innere Schicht der Zona pellucida durchdringen, um deren Ernährung sicherzustellen. Die Corona radiata besteht aus zwei bis drei Zellschichten, die direkt an die Zona pellucida anschließen. Alle Schichten der Corona radiata entlassen Zytoplasma-Fortsätze zur Zona pellucida, die sich, bevor sie in sie eindringen, in kleinere aufspalten (ALBERTINI et al. 1975; KOHATA et al. 2007; LIEBICH 2010). Die im Tertiärfollikel dicht liegenden, mehrschichtigen Follikelepithelzellen in der Follikelwand werden aufgrund ihres körnigen Aussehens als Stratum granulosum bezeichnet (LIEBICH 2010). Bei Untersuchungen mit einem Rasterelektronenmikroskop wurde die Morphologie der verschiedenen Granulosazellen genau charakterisiert. Die basale Schicht der Membrana granulosa, die insgesamt aus etwa vier bis fünf Zellschichten besteht, zeigt hochprismatische Zellen. Die Zellen der darüberliegenden Schicht sind auch hochprismatisch und entlassen feine Zytoplasmaausläufer in Richtung der Basalmembran. Auch untereinander sind die Granulosazellen durch zahlreiche Zytoplasmaprojektionen und Pseudopodien verbunden. Die luminal gelegene Schicht der Membrana granulosa besteht ebenso wie der Cumulus oophorus aus vorwiegend runden Zellen (KOHATA et al. 2007). Sowohl zwischen den Granulosazellen, als auch an den Verbindungen mit der Eizelle bestehen zahlreiche „gapjunctions“ verschiedener Größe und Morphologie (ALBERTINI et al. 1975). Nach der Basalmembran schließt nach außen die zell- und gefäßreiche Theca folliculi interna an, deren lipid- und mitochondrienreiche Zellen auch zur Steroidhormonsynthese, sowie zur Ernährung des gefäßlosen Follikels zuständig sind (SINOWATZ & HEES 2012). Die äußere faserige Schicht, die Theca folliculi externa, welche vorwiegend aus Myofibroblasten und Fibroblasten besteht, stellt nur eine undeutliche Begrenzung des Follikels gegenüber dem Stroma dar. Sie enthält sowohl myelinisierte, als auch unmyelinisierte Nervenfasern (BURDEN 1972). Bei der Katze lässt sich die Theca nicht eindeutig in eine innere und äußere Schicht teilen, wie dies bei den anderen Säugetieren der Fall ist (GURAYA 1981).

1.5.5. Zona pellucida

Die Zona pellucida ist eine aus Glykoproteinen aufgebaute extrazelluläre Schicht, die die Eizelle umschließt und während der Follikulogenese gebildet wird (GUPTA et al. 2012). Sie ist bei allen Säugetieren zu finden und zeigt Spezies-

spezifische Unterschiede. Die Hauptbestandteile sind bei den meisten Säugetieren vier verschiedene Glykoproteine; ZP1, ZP2, ZP3 und ZP4. Bei der Maus ist die Zona pellucida aus drei Glykoproteinen aufgebaut (SINOWATZ et al. 2001; WASSARMANN 2008; BRAUN et al. 2009; GUPTA et al. 2012). Diese unterscheiden sich durch ihr Molekulargewicht und wurden mittels SDS-Page differenziert, wobei ZP1 das größte und ZP3 das kleinste Glykoprotein ist. Jedes besteht aus einem Proteinhauptteil, mit N- und O-verknüpften Oligosaccharidseitenketten (WASSARMANN 1988 & 2008; JEWGENOW & RUDOLPH 2001; BARBER et al. 2001; LUNN & WRIGHT 2009). In Reaktionen mit Lektinen sowie PAS- und Alcianblau-Färbungen wurden bei der Zona pellucida der Katze sulfatierte, saure und neutrale Glykokonjugate nachgewiesen. Durch positive Reaktionen mit WGA wurde vor allem das Vorkommen von D-Galaktose und N-acetyl-D-Galaktosamin-Resten nachgewiesen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Zuckerstrukturen an der Zona pellucida nach der Ovulation verändert werden, da im Eileiter befindliche Oozyten andere Glykosylierungsmuster als die im Follikel eingeschlossenen liefern (KIMURA et al. 1989). Die Zona pellucida ist deutlich ab dem Stadium des Sekundärfollikels zu erkennen, bei der Katze kann man sie elektronenmikroskopisch auch schon in den meisten Primärfollikeln nachweisen (CARRIJO et al. 2010). Barber et al. konnten sie mit spezifischen Antikörpern nach der Differenzierung der Granulosazellen vom flachen zum isoprismatischen Epithel nachweisen, also während der Umformung des Primordial- zum Primärfollikel. Allerdings fanden sie nur das Glykoprotein ZP1. Erst im Sekundärfollikel sind alle vier Glykoproteine nachweisbar (JEWGENOW & FICKEL 1999; BARBER et al. 2001; JEWGENOW & RUDOLPH 2001). Die Dicke variiert je nach Follikelstadium. Im Primordialfollikel war sie in den durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht nachweisbar. In den Primärfollikeln wurden durchschnittlich 4 µm, in den Sekundärfollikeln 9 µm, und in den Tertiärfollikeln 14 µm gemessen (BARBER et al. 2001). Zur Entstehung der Zona pellucida gibt es verschiedene Theorien. Von mehreren Autoren wird aufgrund ihrer durchgeführten glykohistochemischen oder immunhistochemischen Untersuchungen vermutet, dass die Bildung sowohl eine Beteiligung der Granulosazellen, als auch der Oozyte bedingt (PARILLO & VERINI-SUPPLIZI 1999). Barber et al. wiesen im Ooplasma verteilte große und

membrangebundene Vesikel nach, die positiv auf einen porzinen ZP-Antikörper reagierten (BARBER et al. 2001). Andere Autoren sehen die Zona pellucida als ein primär von den Follikelepithelzellen gebildetes Produkt, da bei entsprechenden immunhistologischen Untersuchungen Zona pellucida Material im Zytoplasma der Granulosazellen schon bei Primordialfollikeln nachgewiesen wurde und kein entsprechendes Material in den Oozyten in verschiedenen Stadien vorhanden war (JEWGENOW & RUDOLPH 2001). In zahlreichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Zona pellucida keine homogene Schicht ist, sondern vielmehr in mindestens zwei unterschiedliche Lagen unterteilt ist. Die innere und die äußere Schicht weisen unterschiedliche Zuckerstrukturen auf, weshalb sie auch unterschiedliche Lektinbindungseigenschaften haben (SKUTELSKY et al. 1994; PARILLO & VERINI-SUPPLIZI 1999). Bei Tertiärfollikeln konnte eine innere kompakte Schicht von 5-7µm Dicke, von einer äußeren diffusen lockeren Schicht unterschieden werden, welche durch die Zellfortsätze der sie umgebenden Granulosazellen vielfach unterbrochen wird (JEWGENOW & RUDOLPH 2001; GABIUS 2009). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen die Zona pellucida als spongiöse Hülle, mit zahlreichen runden oder ovalen Poren, die zwischen 1 bis 5 µm weit waren. Diese durchdringen die mehrschichtige Zona pellucida, laufen zum Teil konisch zu und verzweigen sich in viele kleinere Vertiefungen. Dieser Aufbau verdeutlicht zum einen die vernetzten Filamente der vier verschiedenen Glykoproteine, zum anderen ermöglicht es den Cumulus oophorus Zellen den Kontakt mit der Oocyte zur Ernährung und Signalübertragung (LUNN & WRIGHT 2009).

Die Zona pellucida erfüllt vielfältige Aufgaben bei der Follikelreifung und ist essentieller Teil der speziesspezifischen Eizelle-Spermium-Bindung, indem sie die Akrosomenreaktion induziert und so nach der Befruchtung eine Polyspermie verhindert (JEWGENOW & FICKEL 1999; SINOWATZ & HEES 2012).

1.5.6. Ovulation

Der sprungreife Tertiärfollikel, der auch als Graaf-Follikel bezeichnet wird, wölbt sich über die Oberfläche des Ovars. Zu diesem Zeitpunkt hat sich auch die Eizelle aus dem Cumulus oophorus gelöst und schwimmt, von der Corona radiata und Zona pellucida umgeben, frei in der Follikelflüssigkeit. Bei der Katze wird die erste Meiose schon vor der Ovulation beendet. Die zweite meiotische Teilung

wird erst nach Eindringen eines Spermiums beendet (LIEBICH 2010; SINOWATZ & HEES 2012). Da bei der Katze eine induzierte Ovulation beobachtet wird, erfolgt diese nur nach entsprechendem Stimulus und nicht spontan (SHILLE et al. 1983; TSUTSUI & STRABENFELDT 1993). Der Vorgang der Ovulation wird von verschiedenen Autoren beschrieben. Eine Beteiligung lysosomaler Enzyme, die das Oberflächenepithel sowie einen Teil des Stromas vorübergehend auflösen, wurde von Bjersing und Cajander untersucht (BJERSING & CAJANDER 1975). Ebenso wird die Beteiligung der glatten Muskelzellen diskutiert sowie der Einfluss von Prostaglandinen, Plasminogenaktivatoren und chemischen Mediatoren, der zur Zunahme der Gefäßpermeabilität führt. Auch die Auflösung der „gapjunctions“ und das Zurückziehen der Zellfortsätze der Granulosazellen ist ein deutlicher Hinweis auf eine bevorstehende Ovulation. Alle diese Vorgänge werden endokrin gesteuert. Dabei sind Hypophyse, Hypothalamus und der Follikel selbst beteiligt (OKAMURA et al. 1972; BEERS et al. 1975; OKUDA et al. 1983; KOHATA et al. 2007).

Nach Einreißen der Follikelwand wird die Eizelle aus der Follikelhöhle gespült und in den Fimbrientrichter aufgenommen. Die verbleibende Follikelhöhle bildet sich im Anschluss zu einem Gelbkörper um (SINOWATZ & HEES 2012).

1.6. Gelbkörper

Der Gelbkörper ist eine temporäre auf dem Ovar befindliche Drüse, deren Hauptaufgabe die Progesteronproduktion ist (GURAYA 1969). Da bei der Katze die Ovulation nicht spontan abläuft, finden sich Gelbkörper nur während der Gravidität oder während eines pseudograviden Zyklus. Er entwickelt sich nach der Ovulation aus der verbliebenen Follikelwand, durch Transformation der Granulosa- und Thekazellen zu Steroidhormon-bildenden Luteinzellen (NISWENDER et al. 2000; JEWGENOW et al. 2012). Die Lebensdauer eines Corpus luteum kann man in drei Phasen unterteilen, die hormonell gesteuert werden. Seine Entstehung durch Luteinisierung, das Bestehen während Trächtigkeit oder Pseudogravidität und die Phase des strukturellen und funktionellen Abbaus. In einem pseudograviden Zyklus besteht er etwa 40 Tage, während der Trächtigkeit etwa 67 Tage. Die Hauptaufgabe des Gelbkörpers ist die Produktion von Progesteron, es werden jedoch auch andere Hormone, wie Androgene, Östrogene etc. in geringen Mengen gebildet (NISWENDER et al.

2000; JEWGENOW et al. 2012). Direkt nach der Ovulation ragt häufig ein Blutkoagulum aus der durch die Ruptur entstandene, kraterförmige Öffnung heraus. Durch den Verlust der Follikelflüssigkeit und den so gesunkenen Innendruck legt sich die Wand in Falten. Allerdings rupturieren nach induzierter Ovulation nicht immer alle Follikel. Daher können auch nicht rupturierte Follikel in Gelbkörper umgewandelt werden (DAWSON 1941; SINOWATZ & HEES 2012). Nach drei Tagen ist die Follikelwand deutlich verdickt und die Falten liegen eng aneinander. In den folgenden vier Tagen entwickelt sich der Gelbkörper rapide. Die Öffnung zur Oberfläche verschwindet und das Lumen wird vollständig von Zellen ausgefüllt. Bindegewebige Septen lassen die ursprüngliche Einfaltung noch erahnen. 10-16 Tage nach der Kopulation erreicht der Gelbkörper seine maximale Größe. Ab dem 20. Tag nimmt seine Größe wieder kontinuierlich ab. Das Corpus luteum kann entweder gut in das Ovargewebe eingebettet sein und nur wenig herausragen oder sich prominent über die Oberfläche des Ovars hervorwölben (DAWSON 1941). Bei histologischer Untersuchung erkennt man schon vor der Ovulation, dass einige Theca interna Zellen hypertrophieren, die wandständigen Granulosazellen nicht mehr so kompakt erscheinen und einzelne hypertrophieren. Nach der Ovulation und dem Einfalten der Follikelhöhle verlieren viele Thekazellen ihre fibroblastenartige Form und werden rund. 36 Stunden nach der Begattung verschwindet die Basalmembran zwischen den Granulosazellen und den Thekazellen (DAWSON 1941). Die Gefäße bleiben jedoch noch einige Stunden unverändert, als Grenze zwischen diesen Schichten. 48 Stunden nach der Paarung wandern die Thekazellen in die Granulosazellschichten ein und Kapillaren sprossen in die bis dahin gefäßfreie Follikelwand (DAWSON 1941; SINOWATZ & HEES 2012). Anschließend sind in den Granulosa- und Thekazellen Mitosen bis zum siebten Tag zu finden. Parallel dazu findet die Luteinisierung dieser Zellen statt, ausgelöst durch den präovulatorischen LH-Peak, welcher sowohl eine morphologische, als auch funktionelle Umwandlung der Zellen bewirkt. Neben LH (Luteinisierendes Hormon) wird auch eine Beteiligung der Hormone GH (Growth Hormon), Prolaktin, IGF-I (Insulin-like-growth-factor I), Oxytocin, PGE_{2α} (Prostaglandin E_{2α}) und PGI_{2α} (Prostaglandin I_{2α}) vermutet (DAWSON 1941; JEWGENOW et al. 2012). Die Granulosazellen werden zu Granulosaluteinzellen oder großen Luteinzellen. Die Zellen hypertrophieren und nehmen eine runde Form an. Das Zytoplasma erscheint perinukleär homogen, in

der äußeren Region erscheint es vakuolisiert mit zahlreichen Lipideinschlüssen (DAWSON 1941; NISWENDER et al. 2000; ARIKAN et al. 2009; JEWGENOW et al. 2012). Auch die Enzymausstattung der Zellen ändert sich, um die Steroidhormonsynthese bewerkstelligen zu können. In den Lipideinschlüssen sind vorwiegend Cholesterol und seine Ester, die Hauptsubstrate der Progesteronsynthese zu finden. Da diese an der inneren Mitochondrienmembran stattfindet, werden die Lipidtropfen in der Zelle mithilfe des Zytoskeletts zur äußeren Mitochondrienmembran transportiert, um dann rezeptorgesteuert von der äußeren zur inneren Membran zu gelangen (NISWENDER et al. 2000). Außer den zahlreichen Lipidtropfen werden auch Lipochrome eingelagert und die Zellen entwickeln ein gut ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum (GURAYA 1969; SINOWATZ & HEES 2012). In neueren Untersuchungen wurde festgestellt, dass sich auch bei den Katzen die kleinen Luteinzellen in große Luteinzellen umwandeln können (ARIKAN et al. 2009). Neben den Steroid-bildenden Zellen existieren auch nicht-Steroid-bildende Zellen, wie Fibroblasten und von diesen gebildetes Kollagen, Makrophagen und Endothelzellen, die für die Funktion des Gelbkörpers als endokrine Drüse notwendig sind. Vor allem die Entwicklung eines ausgeprägten Kapillarplexus gewährleistet den schnellen Transport der Hormone zu den Erfolgsorganen. Die Reste der Theca interna bilden zusammen mit der Theca externa eine bindegewebige Kapsel, die das Corpus luteum umgibt (DAWSON 1941; MURPHY 2000; ARIKAN et al. 2009). Die Veränderungen der Luteinzellen finden auch beim Corpus luteum graviditatis bereits ab dem 20. Tag statt; die Zellen verlieren ihre typische Vakuolisierung. Allerdings ist erst ab dem 50. Tag eine fettige Degeneration nachweisbar (DAWSON 1941). Der Auslöser für die Luteolyse ist $\text{PGF}_{2\alpha}$, das aus Uterus oder Placenta stammt. Es wirkt primär an den Endothelzellen, so dass es durch die gestörte Blutversorgung zuerst zum Absinken des Progesteronspiegels kommt und anschließend zum Untergang der Luteinzellen (NISWENDER et al. 2000).

1.7. Polyoozytäre Follikel

In der Regel enthält jeder Follikel der Säugetiere nur eine Eizelle. Bei einigen Tierarten, wie der Katze, dem Hund, dem Kaninchen und beim Menschen treten auch polyoozytäre Follikel mit mehreren Eizellen pro Follikel auf (DEDERER 1934; TELFER & GOSDEN 1987; PAYAN-CARREIRA & PIRES 2008;

REYNAUD et al. 2010). Besonders häufig ist dieses Phänomen bei der Hündin zu finden, aber auch bei den Katzen kommen Follikel mit mehreren Eizellen regelmäßig vor. In der Literatur finden sich Angaben über eine Häufigkeit von 4% der im Wachstum befindlichen Follikel (TELFER & GOSDEN 1987; REYNAUD et al. 2010). Zu Beginn ihrer Entdeckung wurden die polyoozytären Follikel als pathologisch betrachtet. Inzwischen gibt es verschiedene Meinungen, ob diese ein physiologisches oder pathologisches Phänomen sind (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF 2006; REYNAUD et al. 2010). Ihre Morphologie unterscheidet sich bis auf die vermehrte Anzahl von Oozyten, nicht von der, monoozytärer Follikel im gleichen Stadium. Es gibt keine Hinweise, dass diese eher der Atresie zum Opfer fallen als Follikel mit nur einer Eizelle. Sie wachsen ebenso weiter und können wahrscheinlich sogar ovulieren (REYNAUD et al. 2010). Es gibt drei verschiedene Hypothesen, wie polyovulatorische Follikel entstehen. Durch Teilung einer mehrkernigen Eizelle, durch Fusion mehrerer Follikel oder durch fehlende Teilung bereits im Stadium der Oogonien in den Keimsträngen. Die letzte Theorie wird als die wahrscheinlichste betrachtet (REYNAUD et al. 2010). Mit zunehmendem Alter nimmt die absolute und prozentuale Anzahl der polyoozytären Follikel ab (TELFER & GOSDEN 1987). Shehata entdeckte sogar polyovulatorische Graffollikel in den Eierstöcken einer neugeborenen Katze (SHEHATA 1974).

1.8. Follikelatresie

Da nur die wenigsten der wachsenden Follikel zur Ovulation kommen, wird der Großteil der Follikel in verschiedenen Stadien der physiologischen Follikelatresie zum Opfer fallen. Diese ist ein physiologischer Prozess, der den Untergang eines gesamten Follikels verursacht und nicht nur den einzelner Zellen (RODGERS & IRVING-RODGERS 2010). Dieser Vorgang ist hormongesteuert und essentiell für die Selektion eines dominanten Follikels (KOHATA et al. 2007). Es gibt verschiedene Faktoren die eine Follikelatresie verhindern und andere, die sie auslösen können. Je nach Stadium des Follikels sind das Gonadotropine wie FSH (Follikel stimulierendes Hormon), LH (Luteinisierendes Hormon), Wachstumsfaktoren oder Östrogen, die eine Atresie verhindern. Haben die Follikel erst ihr Ruhestadium verlassen und beginnen sich zu differenzieren, sind sie am Anfang primär auf FSH angewiesen um weiter wachsen zu können und der Atresie zu entgehen (KAIPIA & HSUEH 1997). Bei den präantralen Follikeln

gehen die Eizellen zuerst unter, wohingegen bei den antralen Follikeln zuerst die Granulosazellen gemeinsam mit den Thekazellen Zeichen eines bevorstehenden Zelltods aufweisen (CLARK et al. 2004; RODGERS & IRVING-RODGERS 2010). Der Untergang eines präantralen Follikels beginnt mit Aussparungen im Zytoplasma der Oozyte. Diese nehmen zu und die Eizelle beginnt zu schrumpfen, so dass die Zona pellucida eine unregelmäßige Form annimmt und nicht mehr in Kontakt mit den umliegenden Granulosazellen steht. Die Eizelle löst sich schließlich komplett auf und es bleibt eine kollabierte Zona pellucida bestehen, da diese nicht so schnell lysiert werden kann (BYSKOV 1974; FORTUNE 1994; WANG et al. 2010). Bei den antralen Follikeln beginnen die degenerativen Vorgänge in der Follikelwand, wobei zwischen basaler und antraler Atresie unterschieden werden kann, je nachdem bei welchen Granulosazellen die Anzeichen des Zelluntergangs zuerst auftreten (RODGERS & IRVING-RODGERS 2010). Zuerst wird die Granulosazellschicht dünner und es sind vereinzelt pyknotische Granulosazellen sowie Apoptosekörperchen zu erkennen. Anschließend lösen sich die Granulosazellen von der Follikelwand und sind in der Follikelhöhle zu finden. Die Zellen des Cumulus oophorus um die degenerierte Oozyte werden pyknotisch. Im weiteren Verlauf wandern Fibroblasten von der Theka in den Follikel ein und sezernieren Kollagen (KAIPIA & HSUEH 1997; RODGERS & IRVING-RODGERS 2010; WANG et al. 2010; SMITH & YELLON 2011). Diese atretischen Follikel sind morphologisch den Thekadrüsen sehr ähnlich (GURAYA 1979; WANG et al. 2010). Bei anderen Tierarten wurde bei den in Degeneration befindlichen Granulosazellen eine veränderte Lipidzusammensetzung der Lipidtropfen gegenüber den normalen Follikeln festgestellt. Die Lipidtropfen normaler Follikel enthalten vorwiegend ungesättigte Phospholipide. In atretischen Follikeln sind auch Triglyceride, Cholesterol und seine Ester nachweisbar (GURAYA & GREENWALD 1964). Dieses Phänomen wurde bei der Katze jedoch nicht beobachtet (GURAYA 1981). Die in der Theca interna gelegenen Luteinzellen hypertrophieren und es werden auch weitere Zellen aus den umliegenden interstitiellen Drüsen integriert. Zusätzlich bilden sich kapilläre Netzwerke und zentral bleiben häufig kleine Reste der Zona pellucida in der kleinen verbliebenen Follikelhöhle zurück (GURAYA 1979; WANG et al. 2010). Die Follikelatresie ist ein komplexer Vorgang, der auf apoptotischen Prozessen, Resorption, Einwandern von Makrophagen, Phagozytose und anschließendem

Einwandern von Fibroblasten beruht (HUGHES & GOROSPE 1991; KAIPIA & HSUEH 1997; RODGERS & IRVING-RODGERS 2010; LIEBICH 2010).

1.9. Ovarreserve

Nach vielen abgelaufenen Zyklen mit Selektion eines dominanten Follikels, Ovulation und Atresie zahlreicher Follikel, ist die Reserve an Eizellen im Ovar erschöpft. Dann sinkt auch die absolute Zahl der bei histologischen Untersuchungen zu findenden Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien im Ovar (KOHATA et al. 2007).

1.10. Zyklus der Hauskatzen

Katzen werden im Alter von 8-10 Monaten, mit einem Gewicht von über 2,5 kg geschlechtsreif. Kurzhaarrassen und orientalische Katzen werden im Allgemeinen deutlich früher geschlechtsreif als langhaarige Rassekatzen (wie z.B. Perser) (TSUTSUI & STABENFELDT 1993). Auch der Zeitpunkt der Geburt wirkt sich auf den Zeitraum bis zur ersten Rolligkeit aus, da es sich um einen saisonal polyöstrischen Zyklus handelt. Da nur bei einer Lichteinwirkung von 12-14 Std der Zyklus in Gang kommt, ist das Ovar bei Katzen, die natürlichen Lichtbedingungen ausgesetzt sind, in den Wintermonaten inaktiv (BUSCH et al. 2009). Bei Katzen, die nicht unter künstlichem Licht gehalten werden, kann man zwischen Januar und August in zwei bis drei Wochen Intervallen Östrusanzeichen sehen. Da die in normalen Haushalten lebenden Katzen auch während der Nacht künstlichem Licht ausgesetzt sein können, läuft bei einigen der Zyklus auch asaisonal ab (TSUTSUI & STRABENFELDT 1993).

In der so genannten Rolligkeit, die man in eine Proöstrus und Östrusphase unterteilen kann, zeigen die Katzen typische Verhaltensänderungen wie vermehrtes Kopfreiben, mit den Hinterpfoten treten, Schreien und über den Boden rollen. Nur im Östrus lässt die Kätzin eine Paarung mit dem Kater zu (SHILLE et al. 1979; TSUTSUI & STRABENFELDT 1993; BUSCH et al. 2009). Die Dauer des Östrus ist im Frühjahr mit durchschnittlich acht Tagen deutlich länger als gegen Ende der Saison, wo die Katzen nur noch ein bis sechs Tage rollig sind (RÜSSE & SINOWATZ 2010).

Die Katze hat eine induzierte Ovulation, die durch den Deckakt oder einen vergleichbaren vaginalen Stimulus ausgelöst wird. Post copulationem wird im Hypophysenvorderlappen vermehrt LH ausgeschüttet, welches ca. zwei Stunden

nach dem Deckakt den höchsten Wert erreicht und nach acht Stunden wieder den Basalwert erreicht. 24-36 Stunden nach dem Koitus wird die Ovulation der reifen Follikel ausgelöst. Bei einer Bedeckung am dritten Tag des Östrus sind die Konzeptionschancen optimal, da durch die vorhergehende Einwirkung von Östrogen das Ovar optimal vorbereitet ist. Sogar eine einzige Kopulation kann zur Ausschüttung von genug LH führen um eine Ovulation auszulösen (SHILLE et al. 1983; TSUTSUI & STRABENFELDT 1993; BUSCH et al. 2009). Durch Einwirkung von Östrogen wird die Zahl der Progesteron-Rezeptoren erhöht, wohingegen Progesteron zu einer Verminderung der Östrogen-Rezeptoren im Reproduktionstrakt führt (NISWENDER et al. 2000).

Findet in der Zeit des Östrus keine Bedeckung statt bzw. wird keine Ovulation ausgelöst, folgt ein anovulatorischer Zyklus, der im Schnitt 21 Tage dauert. Dabei entsteht kein Corpus luteum (BUSCH et al. 2009).

Erfolgt eine Ovulation ohne Befruchtung, entstehen Corpora lutea, die Progesteron produzieren und den Zyklus durch eine „Pseudogravidität“ auf ca. 35-45 Tage verlängern. Bis zum 15. Tag steigt die Progesteronkonzentration an, danach sinkt sie wieder langsam ab und erreicht den Basalwert 35-40 Tage nach der Ovulation. Nach Abbau der Gelbkörper folgt der nächste Zyklus (PAAPE et al. 1975; SHILLE & STRABENFELDT 1979; TSUTSUI & STRABENFELDT 1993; RÜSSE & SINOWATZ 2010).

Nach Ovulation und Befruchtung der Eizellen schließt sich eine 64-67 Tage dauernde Trächtigkeit an, über deren Zeitspanne die Corpora lutea auf dem Ovar bestehen bleiben. Bis zum 30. Tag steigt die Progesteronkonzentration an, danach sinkt sie für den Rest der Trächtigkeit wieder langsam ab, wohingegen Östrogen und LH ansteigen. Ein weiteres Hormon, das ab dem 20. Tag der Gravidität nachweisbar ist, ist das von der Plazenta produzierte Relaxin sowie ab dem 35. Tag das aus dem Hypophysenvorderlappen stammende Prolaktin (SCHMIDT et al. 1983; TSUTSUI & STRABENFELDT 1993).

2. Lektine

Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine oder Glykoproteine, die keine enzymatische Aktivität aufweisen, nicht zur Gruppe der Antikörper oder der Sensor- bzw. Transportproteine für Mono- und Oligosaccharide gehören. Sie ändern ihren Liganden nicht, werden nicht erst nach einem entsprechenden Antigenkontakt gebildet und binden die entsprechenden Zuckerstrukturen ohne ein entsprechendes Signal auszulösen oder sie zu transportieren (GABIUS et al. 1988; GABIUS et al. 2011).

2.1. Geschichte der Lektine

Hermann Stillmark war 1888 der erste, der eine hämagglutinierende Substanz aus dem Samen des Wunderbaums (*Ricinus communis*) beschrieb (RÜDIGER 1981; GABIUS et al. 1988; SHARON & LIS 2004). Der Name „Lektin“ wurde erst im Jahre 1954 von Boyd und Shapleight eingeführt. Abgeleitet ist es von dem lateinischen Wort *legere* (=auswählen), welches die Fähigkeit spezifische Zucker zu binden widerspiegelt, die zunächst in Zusammenhang mit den menschlichen Blutgruppen beobachtet wurde. Es fanden sich spezifisch agglutinierende Lektine für die verschiedenen Blutgruppen des ABO-Systems (BOYD & SHAPLEIGHT 1954; SHARON & LIS 1972; GOLDSTEIN 1980; RÜDIGER 1981; GABIUS et al. 1988). Vorher wurden die aus Pflanzen isolierten agglutinierenden Substanzen als Phytohämagglutinine bezeichnet. Die Lektine, die wir heute kennen und verwenden, stammen neben Pflanzen auch aus Mikroorganismen, Pilzen sowie von Tieren (BOYD & SHAPLEIGHT 1954; RÜDIGER 1981 & 1982; GABIUS et al. 1988; ROTH 2011). Da sich die Lektine durch ihre Fähigkeiten auszeichnen Zellen zu agglutinieren, besitzen sie mindestens zwei Zuckerbindungsstellen. Sie können sowohl in gelöster Form, als auch membrangebunden auftreten (GOLDSTEIN 1980; LIS & SHARON 1986; GABIUS 2009).

2.2. Bindungseigenschaften

Die Lektine werden aufgrund ihrer Zuckerbindungsspezifität eingeteilt, die in Agglutinationsversuchen mit und ohne Hemmzucker festgestellt wurden (RÜDIGER 1998; ROTH 2011). Dabei handelt es sich nicht nur um Interaktionen zwischen Lektin und Glykan,

sondern auch um elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen. Lektine sind nicht nur spezifisch für ein bestimmtes Monosaccharid. Auch die Konformation und die Art der Bindung dieses Zuckers sowie die weiteren Zuckerreste eines Oligosaccharids spielen für die Bindung des Lektins an seinen Liganden eine Rolle (WU et al. 2009; ROTH 2011).

Abkürzung	Name	Herkunft	Zuckerspezifität
Con A	Concanavalin Agglutinin	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwert-bohne)	D-Mannose; D-Glukose
WGA	Wheat germ Agglutinin	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	N-Acety-D-Glukosamin; N-Acetyl-D-Neuraminsäure
WGAs	Succinylated Wheat germ Agglutinin	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	N-Acetyl-D-Glukosamin
PSA	Pisum sativum Agglutinin	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	D-Mannose; D-Glukose
RCA	Ricinus communis Agglutinin	<i>Ricinus communis</i> (Ricinusbohne)	D-Galaktose
PHAE	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Oligosaccharide
PHAL	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Oligosaccharide
GSA I	Griffonia simplicifolia	<i>Griffonia simplicifolia</i>	N-Acetyl-D-Galaktosamin

	Agglutinin I	(Afrikanische Schwarzbohne)	
VAA	Viscum album Agglutinin	<i>Viscum album</i> (Mistel)	Galaktose; N-Acetyl-D- Neuraminsäure
MAA I	Maackia amurensis Agglutinin I (Leukoagglutinin)	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	N-Acetyl-D- Neuraminsäure
SNA	Sambucus nigra Agglutinin	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Hollunder)	N-Acetyl-D- Neuraminsäure; N-Acetyl-D-Galaktosamin
SJA	Sophora japonica Agglutinin	<i>Sophora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)	N-Acetyl-D-Galaktosamin

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Lektine, modifiziert nach Goldstein & Poretz 1986; Wu et al. 2009; Gabius et al. 2009; Lohr et al. 2010; Gabius et al. 2011; Rodler & Sinowatz 2011; Roth 2011

2.3. Bindungsstellen der Lektine im Ovar

Von anderen Autoren wurden bereits Lektinbindungsstellen am Ovar bei verschiedenen Spezies untersucht, wie z.B. von Parillo bei Rind, Schaf, Ziege und Schwein die Lektine Soybean Agglutinin (SBA), Peanut Agglutinin (PNA), Ricinus communis Agglutinin (RCA I), Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSA I), Griffonia simplicifolia Agglutinin II (GSA II) und Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) (PARILLO et al. 1996 & 2000).

Auch bei der Katze wurden glykohistochemische Untersuchungen mit Lektinen durchgeführt. Kiamura et al., Bordach und Parillo & Verini-Supplizi untersuchten die Bindung von Lektinen an die Zona pellucida an Follikeln unterschiedlichen Reifegrades (KIMURA et al. 1989; BORDASCH 1998; PARILLO & VERINI-SUPPLIZI 1999).

3. Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um den Nachweis antigener Strukturen in einem Gewebe mittels spezifisch bindender Antikörper. Diese sind entweder direkt markiert (direkte Immunmarkierung), oder werden über einen in einem zweiten Schritt markierten Sekundärantikörper (indirekte Immunmarkierung) nachgewiesen (ROMEIS et al. 2010; SINOWATZ & HEES 2012).

3.1. Zytoskelett

Das Zytoskelett der Zellen ist ein komplexes Netzwerk, das für die Form, Dynamik und Anpassungsfähigkeit der Zellen verantwortlich ist. Es ist weiter die Grundlage für Zellbewegung, für Transportvorgänge und für die Zellteilung. Das Zytoskelett besteht aus drei verschiedenen Komponenten; den Mikrofilamenten, Intermediärfilamenten und Makrofilamenten (STEWART 1990; HYDER et al. 2008; IWATSUKI & SUDA 2010; ALBERTS 2011).

3.1.1. Mikrofilamente

Die Mikrofilamente werden auch als Aktinfilamente bezeichnet und haben einen Durchmesser von 5-7nm und ein Molekulargewicht von 43.000 Dalton. Sie sind für die Form der Zelloberfläche sowie für die Fortbewegung der Zelle wichtig. Die zweisträngigen helikalen Aktinpolymere sind in der ganzen Zelle verteilt, in stärkster Konzentration finden sie sich jedoch direkt unter der Plasmamembran (LAZARIDES 1982; ALBERTS 2011). Sie können einzeln oder in Bündeln auftreten. Des Weiteren gibt es auch Aktinfilamente mit gebundenem Myosin. In den quergestreiften Muskeln bilden sie die Myofibrillen mit regelmäßiger Anordnung der Aktinfilamente in den Sarkomeren. Auch in anderen Zellen gibt es Aktin-Myosin-Komplexe, die jedoch nicht so exakt wie in den Muskelzellen angeordnet sind. Die Verbindung von Aktin und Myosin erlaubt eine Kontraktion unter ATP-Verbrauch (LAZARIDES 1982; ALBERTS 2011). SMA (α -smooth-muscle-actin), ein aus der Maus isolierter Antikörper ist ein Marker für kontraktile Zellen, die Aktin enthalten. Es reagieren folglich nur stromale Zellen, die kontraktile Elemente enthalten, epitheliale Zellen sind negativ.

3.1.2. Mikrotubuli

Bei den Mikrotubuli handelt es sich um Hohlzylinder, die vorwiegend aus dem globulären Protein Tubulin bestehen. Ihr Durchmesser beträgt etwa 24 nm, mit einer Wanddicke von 5 nm. Die Mikrotubuli unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau und bestehen neben Tubulin aus dem sog. „Mikrotubulus-assoziiertem Protein“ (MAP) (GELFAND & BERSHADSKY 1991; ALBERTS 2011). Neben ihren Funktionen im Spindelapparat während der Zellteilung, bei intrazellulären Transportvorgängen, Positionierung von Zellorganellen und Formveränderungen der Zelle sind sie auch Bestandteil bestimmter Zellorganellen, wie der Zentriolen und der Zilien. Mikrotubuli selbst sind nicht kontraktionsfähig, bieten kontraktile Proteinen jedoch einen Ansatzpunkt. Die Tubulinmoleküle bzw. die Mikrotubuli befinden sich im gesamten Zytoplasma, jedoch vermehrt um die Zentriolen, die als ihre Bildungszentren angesehen werden (GELFAND & BERSHADSKY 1991; ALFA & HYAMS 1991; ALBERTS 2011; SINOWATZ & HEES 2012). Außerdem befindet sich eine größere Ansammlung unter dem Oolemn der Zellmembran der Eizelle. Neben ihren Funktionen bei der Zellteilung sind die Mikrotubuli auch speziell in der Eizelle wichtig für das Ausschleusen des Polkörperchens und die Wanderung der cortikalen Granula (LUCIANO et al. 2009).

3.1.3. Intermediärfilamente

Intermediärfilamente umfasst eine große Gruppe unterschiedlicher Proteine, deren Durchmesser ungefähr 8-10nm beträgt. Intermediärfilamente sind die stabilste Komponente des Zytoskeletts. Sie werden in sechs Klassen eingeteilt, welche ausschnittsweise in der folgenden Tabelle dargestellt sind. Die Einteilung basiert auf den Aminosäuren- und DNA-Sequenzen (LAZARIDES 1982; STEWART 1990; QIN et al. 2010; IWATSUKI & SUDA 2010; ALBERTS 2011).

IF-Klasse	Intermediärfilament	Vorkommen in der Zelle
Klasse I	Saure Keratine	Epithelzellen
Klasse II	Basische Keratine	Epithelzellen
Klasse III	Vimentin,	Zellen mesenchymaler Herkunft

	Desmin, etc.	Muskelzellen
Klasse IV	Neurofilamentäres Tripletprotein Synemin	Nervenzellen Muskelzellen, ZNS
Klasse V	Nukleäre Lamine	Zellkern
Klasse VI	Phakinin, Filensin	Linse

Tabelle 2: Intermediärfilamentklassen modifiziert nach Iwatsuki & Suda 2010; Hees & Sinowatz 2012

Die vielfältigen Funktionen der Intermediärfilamente umfassen die Bildung von Zell-Zell-Kontakten, wie Hemidesmosomen oder Desmosomen, wobei diese je nach Organ aus verschiedenen Intermediärfilamenten bestehen können. Die Beteiligung an Vorgängen, wie der Bewegung und Fixation von Zellorganellen, Zellpolarität, Genregulation sowie die intrazelluläre Signalübertragung ist inzwischen unumstritten (ERIKSSON et al. 2009; QIN et al. 2010; IWATSUKI & SUDA 2010).

Die Morphologie der Intermediärfilamente ist bei allen Intermediärfilament-Klassen ähnlich. Sie verfügen über eine dreigeteilte Domänenstruktur, mit einer zentralen α -helikalen Rod-Domäne, sowie einem nicht helikalen N-terminalen Kopf- und C-terminalen Schwanzbereich. Die Steuerung erfolgt über Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Serin-Rests in den Kopf- und Schwanzbereichen (STEWART 1990; IWATSUKI & SUDA 2010). In nicht polarisierten Zellen gibt es zwei verschiedene Netzwerke von Intermediärfilamenten im Zytoplasma; das juxtanukleäre, welches um den Zellkern lokalisiert ist, sowie das radiäre Netzwerk, welches an das juxtanukleäre anschließt und sich in die Zellperipherie fortsetzt. Im Vergleich dazu existieren in polarisierten Zellen (mit einer apikalen und basalen Seite) sieben verschiedene Arten von Intermediärfilament-Netzwerken im Zytoplasma. Diese sind: das apex-, periphere-, Granula-assoziierte-, Golgi-assoziierte-, radiäre-, juxtanukleäre-, und gesamte zytoplasmatische Netzwerk. Die Zusammensetzung der verschiedenen Netzwerke unterscheidet sich je nach Zellart und Funktionszustand (IWATSUKI & SUDA 2010).

3.1.3.1. Zytokeratine

Es gibt über 20 verschiedene Keratinarten, die in saure und basische unterschieden werden können. Zytokeratine sind in Epithelzellen bzw. in Zellen ektodermalen bzw. entodermalen Ursprungs vorhanden. Durch diese erhalten die Zellen eine mechanische Festigkeit, indem sie Intermediärfilamente an Desmosomen oder Hemidesmosomen verankern. Daher bestehen die Zell-Zell-Verbindungen in Epithelzellen vorwiegend aus Zytokeratinen. Ein Keratinfilament besteht aus einem Heterodimer von Klasse I und Klasse II Keratinen. Diese lagern sich wiederum zu einem Tetramer aus zwei Heterodimeren zusammen. Das über Disulfidbrücken verbundene Keratinnetzwerk verleiht den Epithelzellen eine hohe Stabilität (LAZARIDES 1982; SCHWEIZER et al. 2006; ALBERTS 2011). Es wurden bereits zahlreiche immunhistochemische Untersuchungen mit Zytokeratinen an Ovarien verschiedener Tiere durchgeführt, wie z.B. bei Hund und Katze, bei der Wachtel oder beim Rind (ESPINOSA DE LOS MONTEROS et al. 1999; AKIHARA et al. 2007; RODLER & SINOWATZ 2011; WENDL et al. 2012). Dabei wurden vor allem positive Reaktionen an dem Keimdrüsenepithel, sowie im Rete ovarii detektiert. Auch das Follikelepithel vom Primär- bis zum Tertiärfollikel reagierte in einigen Fällen.

3.1.3.2. Vimentin

Vimentinfilamente sind eine wichtige Komponente des Zytoskeletts. Es kommt in Zellen mesenchymaler Herkunft vor (wie z.B. in Endothelzellen und Fibroblasten). Vimentinfilamente sind durchschnittlich ca. 10nm dick, haben jedoch dabei ein ähnliches Molekulargewicht wie Tubulin (ERIKSSON et al. 2009). Sie bilden hoch dynamische Strukturen, die es ermöglichen, die zellulären Prozesse an geänderte Bedingungen anzupassen. Sie enden häufig an der Kernmembran, an Desmosomen oder Hemidesmosomen. Auch die Lage des Nukleus und der Zentriolen wird unter anderem von den stabilen Vimentinfilamenten beeinflusst. Ihr Abbau wird wie auch bei anderen Intermediärfilamenten über die Proteinphosphorylierung gesteuert (LAZARIDES 1982; ALBERTS 2011). Gemeinsam mit Desmin und Synemin kommt Vimentin vor allem in glatten Muskelzellen verschiedener Gefäße sowie in Vorstufen von Muskelzellen vor (GRANGER & LAZARIDES 1980; GABBIANI et al. 1981; LAZARIDES 1982;

ERIKSSON et al. 2009). Bereits 1982 wurde Vimentin in den Granulosazellen von Säugetier-Eierstöcken nachgewiesen (LAZARIDES 1982). Es existieren auch zahlreiche Untersuchungen neueren Datums zur Lokalisation von Vimentin in Ovargewebe verschiedener Spezies. Vimentin wurde vor allem in Endothelzellen und in stromalen Zellen nachgewiesen. Ebenso kam es im Rete ovarii, in den Granulosazellen der Primär- Sekundär- und Tertiärfollikel, der Tunica albuginea und den endokrinen Zellen vor (AKIHARA et al. 2007; MADEKUROZWA 2012; RODLER & SINOWATZ 2011; WENDL et al. 2012).

3.1.3.3. Synemin / Desmin

Diese Intermediärfilamente sind vorwiegend in der differenzierten quergestreiften Muskulatur zu finden. Desmin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53.000 Dalton, das aus vier Untereinheiten besteht und zur Klasse III der Intermediärfilamente gehört. Synemin liegt als Dimer vor und besitzt ein Molekulargewicht von 230.000 Dalton und wurde erstmals in der quergestreiften Muskulatur des Vogels beschrieben. Der Name Synemin wurde aus dem griechischen abgeleitet, aus „syn“ (mit) und „nema“ (Filament), da es sich zusammen mit den Intermediärfilamenten Desmin und Vimentin in den Muskelfasern befindet (GRANGER & LAZARIDES 1979 & 1980; BILAK et al. 1998). Synemin und Desmin verknüpfen die Myofibrillen zu Bündeln und verbinden in gegenseitiger Interaktion die Z-Scheiben miteinander. Diese zwei Intermediärfilamente spielen demzufolge eine entscheidende Rolle zur Stabilisierung des Sarcolemmverbandes (HERRMANN et al. 2007; ERIKSSON et al. 2009; ALBERTS 2011). In den Muskelzellen finden sich diese Intermediärfilamente sowohl am Zellkern, an den Mitochondrien, den Desmosomen und an den Z-Scheiben der Sarcomere (LAZARIDES et al. 1982; QIN et al. 2010). Die Desminfilamente bilden durch Zusammenlagerung zu Strängen in den Skelett- und Herzmuskelzellen die Desmosomen (JASTROW 1998; ALBERTS 2011). Synemin ist ebenso wie Desmin in der Muskulatur vorhanden, wird allerdings zu Klasse IV der Intermediärfilamente gezählt. In früheren Studien wurde Desmin im bovinen Ovar nur in den glatten Muskelzellen der Gefäße nachgewiesen. Bei Untersuchungen des Ovars der Wachtel waren nur mesenchymale Zellen und eine Schicht Thekazellen positiv, wohingegen Akihara et al. beim caninen Ovar neben den glatten Muskelzellen auch Reaktionen am Keimdrüsenepithel, am Rete ovarii und auch schwach ausgeprägt an der Tunica

albuginea feststellen konnte (AKIHARA et al. 2007; MADEKUROZWA 2012; WENDL et al. 2012).

3.2. Laminin

Laminin ist ein nichtkollagenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 850.000 Dalton, welches in sämtlichen Basalmembranen verschiedener Gewebe nachweisbar ist (TIMPL et al. 1979). Es ist Hauptbestandteil der Basallamina, einer extrazellulären Matrix, die zwischen 40 und 120nm dick ist und von den angrenzenden Epithel- und Bindegewebszellen gebildet wird. Eine Basallamina befindet sich immer unterhalb eines Epithels oder eines Endothels und ermöglicht eine Zellpolarität (apikal/basal) und somit auch eine Differenzierung in verschiedene Zellschichten (IRVING-RODGERS et al. 2004). Daneben hat die extrazelluläre Matrix noch zahlreiche weitere Funktionen; sie beeinflusst Follikelwachstum, Vitalität, Steroidsynthese, Eizellreifung und vieles mehr (BERKHOLTZ et al. 2006). Außer Laminin enthält die Basallamina noch andere Glykoproteine, wie Kollagen Typ IV und Nidogen sowie Proteoglykane (z.B. Perlecan) (TIMPL 1989). Bei Laminin-1, das für die Struktur dieser Membran hauptverantwortlich ist, handelt es sich um ein großes Protein, das aus drei langen Polypeptidketten (α, β, γ) besteht, die über Disulfidbrücken kreuzförmig miteinander verknüpft sind (ROHDE et al. 1979; TIMPL 1989; ALBERTS 2011). In immunhistochemischen Untersuchungen wurde am Ovar der Wachtel Laminin in der Basalmembran unter dem Keimdrüsenepithel und unter den Granulosazellen der Follikel verschiedener Stadien nachgewiesen (RODLER & SINOWATZ 2011; MADEKUROZWA 2012). Auch bei Säugetieren existiert eine Reihe immunhistochemischer Untersuchungen verschiedener Ovarien. Beim Rind wurde Laminin in der Basalmembran sämtlicher Follikelstadien gefunden sowie in der Basalmembran von Gefäßen und in Bereichen zwischen den Granulosazellen präovulatorischer Follikel, in der sog. Focimatrix (fokale intraepitheliale Matrix) (VAN WEZEL et al. 1998; IRVING-RODGERS et al. 2004 & 2006). In den Ovarien der Maus wurde Laminin an der die Follikel umgebenden Basalmembran, der Basallamina von Gefäßen, Bereichen des Gelbkörpers, der Focimatrix, unterhalb des Keimdrüsenepithels und in den Thekazellen detektiert (WORDINGER et al. 1983; BERKHOLTZ et al. 2006; IRVING-RODGERS et al. 2010). Die Analyse postnataler Kaninchen und Schweine Ovarien zeigte, dass die lamininhaltige

Basalmembran schon vor der Primordialfollikel Formation vorhanden ist (LEE et al. 1996).

3.3. Connexin

Connexine sind kanalbildende Proteine, die die sog. „gapjunctions“ bilden. „Gapjunctions“ sind Kontaktstrukturen zwischen benachbarten Zellen, die den Austausch kleiner Moleküle (bis zu 1.000 Dalton Molekulargewicht) oder Ionen ermöglichen. Connexine sind Proteine mit vier Transmembran-Domänen, einer intrazellulären und zwei extrazellulären Schleifen sowie den intrazellulären C- und N-terminalen Enden. Sechs Connexine können sich zu einem Connexon zusammenlagern. Zwei Connexone oder Hemikanäle in aneinander angrenzende Plasmamembranen zweier Zellen treffen sich im intrazellulären Spalt und bilden eine durchgängige Pore, eine sog. „gapjunction“. Treffen sich zwei identische Connexone handelt es sich um einen homotypischen Kanal, lagern sich hingegen zwei ungleiche Connexone zusammen spricht man von einem heterotypischen Kanal (HERVÉ 2004 & 2005; GERSHON et al. 2008; ALBERTS 2011; HERVÉ & DERANGEON 2013).

Im Ovar sind die „gapjunctions“ essentiell für die Kommunikation der Oozyten mit den Granulosazellen. Sie wurden mithilfe von Connexin 43 bereits in Follikeln verschiedener Tierarten nachgewiesen, wie beim Schaf, Rind, Schwein, Ratte oder der Maus. Bei den meisten untersuchten Tieren konnte eine Gonadotropin-abhängige Regulation nachgewiesen werden (PÉREZ-ARMENDARIZ et al. 2003; BOROWCZYK et al. 2006; GERSHON et al. 2008; BERISHA et al. 2009; SASSEVILLE et al. 2009). Außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Follikelwachstums und der Follikelatresie. Kurz vor der Ovulation, nach dem LH-Peak, lässt sich ein signifikanter Rückgang der Connexine in den in der Wachstumsphase befindlichen Follikeln verzeichnen. Durch den Verlust der interzellulären Verbindungen wird das Gewebe auf die Ovulation vorbereitet. In der frühen lutealen Phase steigt die Zahl der „gapjunctions“ wieder deutlich an und es ist eine Zunahme an Connexin zu verzeichnen (BERISHA et al. 2009).

Es gibt viele verschiedene Connexin-Isotypen, die in unterschiedlichen Geweben im Organismus auftreten. Das Connexin 43 ist das meist exprimierte und verbreitetste Protein im Wirbeltier, welches in zahlreichen verschiedenen Zellen zu finden ist. (HERVÉ 2005) Die „gapjunctions“ im Ovar bestehen vorwiegend aus

den Connexinen 43 und 37 (GERSHORN et al. 2008). Daher wird in dieser Arbeit ein monoklonaler Connexin 43 Antikörper aus dem Kaninchen als Indikator für die Verbreitung der „gapjunctions“ im Ovar der Katze verwendet.

3.4. S 100

Das saure, Ca^{2+} -bindende Protein S100 wurde 1965 zum ersten Mal von Moore beschrieben, der es im Nervensystem verschiedener Tierarten nachwies. Da es vor allem in der Neuroglia des ZNS und PNS gefunden wurde, hielt er es für neurospezifisch (MOORE 1965). Allerdings ist S100 auch in vielen anderen Geweben nachweisbar (KAMIYA et al. 1989). Es wurde mit vielfältigen zellulären Funktionen in Zusammenhang gebracht, wie z.B. die Interaktion von S100 mit dem Mikrotubulus-System, Beteiligung bei der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung, Rezeptoraktivierung, Calcium Homöostase, Proteinphosphorylierung etc. (DONATO 1986). Heute besteht die S100 Familie aus 24 verschiedenen S100 Proteinen, die in drei Untergruppen eingeteilt werden können. Eine mit ausschließlich intrazellulären regulatorischen Funktionen, intra- und extrazellulären Funktionen und eine Gruppe mit vorwiegend extrazellulären regulatorischen Eigenschaften (DONATO et al. 2013). Bei Untersuchungen an bovinen Ovarien wurden positive Reaktionen am Endothel von Blut- und Lymphgefäßen, an den Eizellen normaler und atretischer Follikel sowie am Epithel des Rete ovarii beobachtet (KAMIYA et al. 1989). Im Gegensatz dazu konnte bei einer Studie am Ovar des Schweines von Mirecka et al. kein S100 Nachweis in den Eizellen erbracht werden. Es färbten sich lediglich die Follikelzellen sämtlicher Follikelstadien an, mit einer Abnahme der Intensität im Verhältnis zur Zunahme der Größe der Follikel. Eine schwache Reaktion war auch bei den Theca interna Zellen zu verzeichnen (MIRECKA et al. 1994). Im caninen Ovar wurde S100 in den stromalen Zellen, dem Rete ovarii und auch schwach in der Tunica albuginea und den endokrinen Zellen detektiert. Die Funktionsgebilde (Follikel und Corpora lutea) wurden bei dieser Studie nicht berücksichtigt (AKIHARA et al. 2007). In einer Untersuchung humaner Ovarien konnte S100 weder im Rete ovarii, noch im Keimdrüsenepithel nachgewiesen werden (WOOLNOUGH et al. 2000). Die Anwendung des S100-Antikörpers ergab auch eine Expression in den Oozyten von Enten (SUGIMURA et al. 1989).

3.5. Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren

Rezeptoren sind Proteine, also eine Folge von Aminosäuren, die sich auf der Zelloberfläche oder auch innerhalb einer Zelle befinden. Die Steroidrezeptoren sind nukleäre Rezeptoren, die in Form von Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma vorliegen. Durch Binden eines Liganden, in dem Fall Progesteron oder Östrogen an das aktive Zentrum des Rezeptors werden sie aktiviert und wandern zum Zellkern (ZÖLLNER & HEIN 2000; ALBERTS 2011). Im Ovar, wie auch in vielen anderen Geweben unterliegt die Expression von Steroidrezeptoren ständigen Auf- und Abbauvorgängen. Werden die Rezeptoren durch ihr spezifisches Signal aktiviert, wird eine Kaskade intrazellulärer Signale in Gang gesetzt, die das Zellverhalten der Zielzelle verändern (ALBERTS 2011). Die Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren sind intrazelluläre Proteine, im Zytoplasma oder an der Kernmembran gelegen, die als liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren wirken. Der Östrogen-Rezeptor besteht aus einer zentralen DNA-bindenden Domäne, einer C-terminalen hormonbindenden Domäne und den variablen F- und E-Domänen (MONTANO et al. 1995). Progesteron-Rezeptoren existieren in zwei Isoformen, PR-A und PR-B, die sich an ihrem N-terminalen Ende unterscheiden und verschiedene Molekulargewichte aufweisen (GRACANIN et al. 2012). Im weiblichen Reproduktionstrakt führt eine Einwirkung von Östrogenen auf das Gewebe in den meisten Zellen zur vermehrten Ausbildung von Progesteron-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu bewirkt Progesteron eine Verringerung der Zahl der Östrogen-Rezeptoren. Die Ausbildung dieser Rezeptoren unterscheidet sich durch die während der verschiedenen Zyklusstadien produzierten Steroidhormonen (NISWENDER et al. 2000). Die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel exprimieren Progesteron-Rezeptoren, vor allem bei ansteigendem LH-Spiegel und sind nicht, wie in anderen Zellen primär Östrogen-abhängig. Das Ansprechen der Granulosazellen auf LH ist stark von ihrem Differenzierungsgrad abhängig (NATRAJ & RICHARDS 1993; CLEMENS et al. 1998). Progesteron-Rezeptoren wurden während der Luteinisierung in den Thekazellen kleiner antraler Follikel, in den Granulosazellen präovulatorischer Follikel und in frühen Gelbkörperstadien nachgewiesen (NATRAJ & RICHARDS 1993).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Material stammt von 21 weiblichen Katzen, deren Ovarien während der Ovariectomie in einer tierärztlichen Praxis entnommen und anschließend sofort für die histologische und histochemische Untersuchung fixiert wurde.

Die Tiere waren zwischen sieben Monaten und neun Jahren alt. Kein Tier war trächtig.

Jeweils ein Eierstock wurde in Formol fixiert, der andere in Bouin'scher Lösung. Vorher wurde das Ovar mit einer dorsalen Schnittführung geteilt, um zwei Anschnittsflächen zu erhalten.

2. Materialvorbereitung für die Lichtmikroskopie

2.1. Probennahme

Entnahme beider Ovarien während der Kastration und unverzügliches Verbringen in die Fixantien.

2.2. Fixierung

2.2.1. Bouin

Der Eierstock wurde 24 Stunden in Bouin'scher Lösung (s. Anhang) verbracht. Anschließend drei Mal je 24 Stunden in 70%igem Ethanol gewechselt, um die Pikrinsäure wieder aus dem Gewebe zu waschen.

2.2.2. Formol

Die Ovarien wurden 48 Stunden in 3,7% Formalin in 100ml Glasflaschen auf einem Rüttler fixiert. Das Formalin wurde dabei mehrmals gewechselt. Anschließend wurden die Proben drei Mal für je zwei Stunden in demineralisiertes (DEPEC) Wasser verbracht und anschließend in 70% igem Ethanol entwässert.

2.3. Einbetten

Im Anschluss an die Fixierung erfolgte das Einbetten mit Hilfe eines Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor der Firma Shandon, Frankfurt). In diesem erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 24 Stunden und die Durchtränkung mit flüssigem Paraplast (Monoject Scientific Inc. Kildare, Irland).

Das Ausgießen der Proben in kleine quadratische Paraplastschalen mit Rahmen erfolgte mit Hilfe des Histostat-Tissue-Embedding Centers (Fa. Reichert-Jung, Wien/Österreich). Zum Abkühlen wurden die Proben ein bis zwei Stunden auf einer Kühlplatte belassen und bis zum Schneiden im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4. Schneiden

Von jeder Probe wurden 30 Schnitte von 5µm Dicke mit dem Rotationsmikrotom (Firma Leitz, Typ 1516) angefertigt. 10 Schnitte wurden jeweils auf unbeschichtete Objektträger (SupraFrost der Firma Menzel-Gläser, Braunschweig), 20 Schnitte auf beschichtete Objektträger (SupraFrostUltraPlus adhäsiv, Firma Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Zum Trocknen wurden die Schnitte zuerst auf einen Wärmestrecktisch verbracht und anschließend für 24 Stunden in einen Wärmeschrank bei 40°C aufbewahrt.

2.5. Färbungen

Bei allen folgenden konventionellen Färbungen wurden die Schnitte vorab zwei Mal 10 min in Xylol verbracht um das Paraffin zu lösen und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest. rehydriert. Nach der Färbung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung durchlaufen und die Schnitte vor dem Eindeckeln mit Eukitt jeweils zwei mal 5 min in Xylol verbracht.

2.5.1. HE-Färbung

Diese einfache Färbung mit den Farbstoffen Hämalaun und Eosin wurde bei jeweils einem Schnitt aller genommenen Proben durchgeführt.

Dabei erzielt man eine blau-violette Kernfärbung sowie eine Rosarotfärbung des übrigen Gewebes. Es wurde wie folgt vorgegangen (ROMEIS et al. 2010).

- Kernfärbung mit Hämalaun: 20 Minuten
- Spülen in Aqua dest.

- Bläuen in fließendem Leitungswasser: 20 Minuten
- Eosin: 10 Minuten
- Spülen in Aqua dest.

2.5.2. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) nach McManus

Bei dieser Färbung stellen sich die PAS-positiven Substanzen (Glykoproteine und Glykogen) rosa bis violettrot dar. Die Kerne erscheinen blau-violett und das übrige Gewebe rosarot. Die 1,2 Glykole werden durch die Perjodsäure zu Aldehyden oxidiert, diese färben sich durch das Schiff'sche Reagenz purpurrot an (ROMEIS et al. 2010).

Bei Amylasevorbehandlung wird das Glykogen durch das Enzym abgebaut, so dass es nicht mehr nachweisbar ist. Dies dient der Unterscheidung von Glykogen gegenüber anderen PAS positiven Substanzen, wie z.B. Glykoproteinen.

Weitere Kontrollreaktionen sind die Acetylierung und die Methylierung der Schnitte. Nach vorheriger Acetylierung können die α -Glykole und α -Aminoalkohole durch die Perjodsäure nicht mehr oxidiert werden, da die funktionellen Gruppen (z.B. $-OH$, $-SH$) durch einen Acetylrest ersetzt wurden (MISLIN 1961; KUMARI et al. 2009).

Durch die Methylierung werden die freien Hydroxylgruppen blockiert, so dass diese nicht durch die enthaltenen Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden können und somit auch nicht durch das Schiff'sche Reagenz angefärbt werden. Polysaccharide können allerdings nicht vollständig methyliert werden (KUMARI et al. 2009).

- Mit Amylasevorbehandlung: ohne vorherige Behandlung der Objektträger 0,5% Amylase auf Schnitte geben, bei 37°C in einer feuchten Kammer in einen Brutschrank geben: 10 Minuten, anschließend in Aqua dest. abspülen
- Mit Acetylierung: bei Raumtemperatur 24 Stunden in Säureanhydrid-Pyridin-Lösung stellen, anschließend zwei Mal 2 Minuten Aqua dest.
- Mit Methylierung: bei 37°C 96 Stunden in 0,1 n-Salzsäure-Methanol-Lösung stellen, anschließend zwei Mal 2 Minuten in Aqua dest.
- 0,5% wässrige Perjodsäure-Lösung: 5 Minuten

- Spülen in Aqua dest.
- Schiff'sches Reagenz (Fuchsin-schweflige Säure): 15 Minuten
- Waschen in Schwefeldioxid-Wasser: 3 x 2 Minuten
- Fließendes Leitungswasser: 5 Minuten
- Hämalun für Kernfärbung: 3-5 Minuten
- Bläuen in fließendem Leitungswasser: 15 Minuten

2.5.3. Trichromfärbung nach Masson und Goldner (Goldner-Färbung):

In dieser Färbung stellen sich die kollagenen Fasern grün da. Die Zellkerne sind braunschwarz und das Zytoplasma ziegelrot. Erythrozyten färben sich gelb (ROMEIS et al. 2010).

- Eisenhämatoxylin nach Weigert: 1 Minute
- 3 x Spülen in Aqua dest.
- Fließendes Leitungswasser: 10 Minuten
- Azophloxin: 5 Minuten
- Spülen in 1% Essigsäure
- Phosphormolybdänsäure-Orange: 15 Sekunden – 30 Minuten (Kontrolle unterm Mikroskop!)
- Spülen in 1% Essigsäure
- Gegenfärbung mit Lichtgrün: 5 – 10 Minuten

2.5.4. Alcianblau 8GX-Färbung (Alcianblau-Färbung): bei pH-Wert 2,5 und bei pH-Wert 1,0

Diese Färbung zeigt eine Blaufärbung saurer Mukosubstanzen. Die Zellkerne färben sich hellrot, das Zytoplasma zartrosa. Bei pH 2,5 färben sich alle sauren Mukosubstanzen blau, bei pH 1,0 nur die sulfatierten. Daher ist eine Unterscheidung zwischen sulfatierten und karboxylierten Gruppen möglich (ROMEIS et al. 2010).

- 3% Essigsäure (pH-Wert 2,5) oder 0,1N Salzsäure (pH-Wert 1,0); 3 Minuten
- 1% Alcianblau 8GX in 3% Essigsäure (pH-Wert 2,5) oder 0,1 N Salzsäure (pH-Wert 1,0); 30 Minuten

- Spülen in 3% Essigsäure (pH-Wert 2,5) oder 0,1 N Salzsäure (pH-Wert 1,0)
- Spülen in Aqua dest.
- Kernechtrot: 3 - 5 Minuten
- Spülen in Aqua dest.

2.5.5. van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung

In dieser Färbung stellen sich die elastischen Fasern blau-schwarz dar, die Kerne färben sich dunkelbraun, kollagene Fasern leuchtend rot und das Muskelgewebe gelb (ROMEIS et al. 2010).

- Resorcinfuchsin-Lösung 22 Minuten
- Fließendes Leitungswasser 1 Minute
- Eisenhämatoxylin zur Kernfärbung 2 Minuten 30 Sekunden
- Drei Mal kurz in Aqua dest. Spülen
- Fließendes Leitungswasser 10 Minuten
- Pikrinsäure-Thiazinrot 5 Minuten
- Aqua dest.
- 96% Alkohol zwei Mal, Kontrolle unterm Mikroskop, ob die überschüssige Pikrinsäure ausgewaschen ist

Die lichtmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation aller konventionellen Färbungen erfolgt an einem Mikroskop (Aristoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar, mit angeschlossener Kamera (Lumera USB Camera Release 3.8) der Firma Lumenera Corporations, Kanada, Ontario.

2.6. Lektine

Bei allen folgenden Lektinfärbungen wurden die Schnitte vorab zwei Mal 30 min in Xylol verbracht um das Paraffin zu lösen und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum 70% Alkohol rehydriert. Anschließend zwei Mal 5 Minuten in Aqua dest., sowie drei Mal 5 Minuten in PBS-Puffer. Nach der Lektinfärbung wurden die Schnitte abgedunkelt drei Mal 5 Minuten mit PBS

gespült und unter Aufbringen eines Tropfens DAPI auf den Objektträger eingedeckelt und die Kanten mit durchsichtigem Nagellack versiegelt.

Es wurde für jede Lektinfärbung eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle angefertigt.

Die Negativkontrolle dient der Unterscheidung von Eigenfluoreszenz und spezifischer Bindung. Dabei wurde statt der Lektinlösung 100µl PBS-Puffer auf die Schnitte aufgebracht.

Für die Positivkontrolle wurde Gewebe verwendet, bei dem eine positive Reaktion mit dem entsprechenden Lektin bekannt ist.

Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop (Axiovert 200M®) mit Kamera (AxioCam ICc 1®) der Firma Zeiss, Oberkochen.

2.6.1. FITC-markierte Lektine

Tabelle 3: verwendete FITC-markierte Lektine

Lektin	Abkürzung	Spezifität
Concanavalin Agglutinin	Con A	D-Mannose; D-Glukose
Wheat germ Agglutinin	WGA	N-Acety-D-Glukosamin; N-Acetyl-D-Neuraminsäure
Succinylated Wheat germ Agglutinin	WGAs	N-Acety-D-Glukosamin
Pisum sativum Agglutinin	PSA	D-Mannose; D-Glukose
Ricinus communis Agglutinin	RCA	D-Galaktose
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	PHA E	Oligosaccharide
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	PHA L	Oligosaccharide

Griffonia simplicifolia Agglutinin I	GSA I	N-Acetyl-D-Galaktosamin
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	N-Acetyl-D-Neuraminsäure; N-Acetyl-D-Galaktosamin

Tabelle modifiziert nach Goldstein und Poretz 1986; Gabius 2009; Wu et al. 2009; Lohr et al. 2010; Gabius et al. 2011; Rodler & Sinowatz 2011; Roth 2011

Diese Lektine wurden mit Ausnahme von Con A und WGA (2,5 µg/ml), auf 5 µg/ml verdünnt, je 100µl pro Schnitt pipettiert. Die Inkubationszeit der Schnitte in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur betrug eine Stunde.

2.6.2. Biotinylierte Lektine

Tabelle 4: verwendete biotinylierte Lektine

Lektin	Abkürzung	Spezifität
Viscum album Agglutinin	VAA	Galaktose; N-Acetyl-D-Neuraminsäure
Maackia amurensis Agglutinin I (Leukoagglutinin)	MAA I	N-Acetyl-D-Neuraminsäure
Sophora japonica Agglutinin	SJA	N-Acetyl-D-Galaktosamin

Tabelle modifiziert nach Goldstein & Poretz 1986; Gabius 2009; Wu et al. 2009; Lohr et al. 2010; Gabius et al. 2011; Rodler & Sinowatz 2011

Diese Lektine wurden auf 10 µg/ml verdünnt und die Objektträger in der Feuchtkammer nach 10-minütiger Vorbehandlung der Schnitte mit Dako Protein-Block-Serum-Free bei Raumtemperatur wurden die Schnitte je eine Stunde mit 100µl der Verdünnung inkubiert. Anschließend drei Mal 5 Minuten in PBS waschen und danach abgedunkelt 30 Minuten mit Streptavidin/FITC in der Feuchtkammer inkubieren.

2.7. Immunhistochemie

Das Prinzip der hier angewandten immunhistochemischen Untersuchungen beruht auf der sog. Avidin-Biotin-Complex Methode (HSU & RAINE 1981). An den Primärantikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper, der wiederum durch den Streptavidin-Peroxidase-Komplex in einem weiteren Reaktionsschritt markiert wird. Da in einem vorherigen Arbeitsschritt die endogene Peroxidase gehemmt wurde, wird durch Zufügen des Substrates 3,3-Diaminobenzidin (DAB, Firma Biotrend, Köln) nur die an den Antikörper gebundene Peroxidase sichtbar gemacht. Sie spaltet H_2O_2 in H_2O und O_2 , welches anschließend das DAB oxidiert und somit braun färbt (ROMEIS et al. 2010).

Kann der Primärantikörper an das Gewebe binden, färbt sich dieses im entsprechenden Bereich braun.

Tabelle 5: verwendete Antikörper

Primär- antikörper	AK-liefernde Tierart	Verdünnung Inkubation	Sekundär- antikörper	Verdünnung Inkubation
Connexin 43 (BD Biosciences, Heidelberg)	Kaninchen	1:300 6°C über Nacht	Anti-Kan. biot. vom Schwein	1:300 30 min RT
Tubulin (Abcam Cambridge, UK)	Maus	1:400 6°C über Nacht	Anti-Maus biot. vom Kaninchen	1:300 30 min RT
ERα (Santa Cruz, Heidelberg)	Kaninchen	1:400 6°C über Nacht	Anti-Kan. biot. vom Schwein	1:300 30 min RT
Progesteron Rezeptor (Rec. Beckman Coulter, Krefeld)	Maus	1:200 6°C über Nacht	Anti-Maus biot. vom Kaninchen	1:300 30 min RT

Synemin (Sigma- Aldrich, Steinheim)	Kaninchen	1:250 6°C über Nacht	Anti-Kan. biot. vom Schwein	1:300 30 min RT
Desmin (Gene Tex, Eching)	Maus	1:200 6°C über Nacht	Anti-Maus biot. vom Kaninchen	1:300 30 min RT
Panzytokeratin (Biocarta, Hamburg)	Maus	1:100 6°C über Nacht	Anti-Maus biot. vom Kaninchen	1:300 30 min RT
Vimentin (Dako, Hamburg)	Maus	1:500 6°C über Nacht	Anti-Maus biot. vom Kaninchen	1:300 30 min RT
Laminin (Serotec, Puchheim)	Kaninchen	1:500 6°C über Nacht	Anti-Kan. biot. vom Schwein	1:300 30 min RT
SMA (Dako, Hamburg)	Maus	1:40 1 Std RT	Anti-Maus biot. vom Kaninchen	1:300 30 min RT
S100 (Dako, Hamburg)	Kaninchen	1:400 30 min RT	Anti-Kan. biot. vom Schwein	1:300 30 min RT

Die Immunhistochemischen Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinieren der Schnitte zwei Mal 30 min in Xylol, anschließend Rehydrieren bis A. dest.
- drei Mal waschen in PBS je 5 min
- Antikörperspezifische Vorbehandlung:
 - S100: Mikrowelle mit Dakopuffer (pH 6,1) zwei Mal 10 min, dann

20 min bei RT abkühlen

- Laminin, Vimentin: 10 min 0,1% Protease bei RT
- Panzytokeratin: 20 min Trypsin bei RT
- Connexin 43, Tubulin, ER α , Progesteron-Rezeptor: Mikrowelle mit Citratpuffer drei Mal 10 min, dann 20 min bei RT abkühlen
- SMA, Desmin, Synemin: keine
- drei Mal 5 min in PBS waschen (Entfällt bei SMA Desmin, Synemin)
- Endogene Peroxidase hemmen; 10 min bei RT in 50ml Hydrogenperoxid plus 150ml A.dest.
- 10 min fließendes Leitungswasser
- drei Mal 5 min in PBS waschen
- Dako Protein Block Serum-Free (Dako, Hamburg) 10 min bei RT in Feuchtkammer
- Primär-AK in Feuchtkammer (siehe Tabelle)
- drei Mal 5 min in PBS waschen
- Sekundär-AK in Feuchtkammer (siehe Tabelle)
- 30 min mit Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Complex (Minarimi) in der Feuchtkammer inkubieren
- drei Mal 5 min in PBS waschen
- 8 min DAB-Hydrogenperoxidlösung bei RT
- 1 min in Leitungswasser waschen
- 30 s Kernfärbung mit Hämalaun
- 10 min fließendes Leitungswasser
- Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe, zwei Mal 10 min in Xylol, anschließend mit Eukitt eindeckeln

Es wurde jeweils eine Negativkontrolle angefertigt, bei der statt dem

Primärantikörper Dako Antibody Diluent (Dako, Hamburg) aufgetragen wurde. Für jeden Antikörper wurde auch eine Positivkontrolle durchgeführt, für die bereits bekannt positives Gewebe verwendet wurde.

Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte an einem Mikroskop (Aristoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar mit angeschlossener Kamera (Lumera USB Camera Release 3.8) der Firma Lumenera Corporations, Kanada, Ontario.

3. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Ovarien von vier Katzen entnommen und mit Hilfe von zwei Rasierklingen in kleine Würfel von 2-4mm Kantenlänge geschnitten.

Anschließend wurden diese in Karnovsky-Lösung (2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7,2), verbracht und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Proben drei Mal 60 Minuten mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) gespült. Danach folgte die Vorkontrastierung mit Osmiumtetroxid (1%) und Kaliumferrocyanid (1,5%) für zwei Stunden, bei 4°C, gefolgt von dreimaligem Waschen in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) und anschließender aufsteigender Alkoholreihe (je 20 Minuten in 30% und 50%, dann je 30 Minuten in 70%, 90% und drei Mal absoluten Alkohol) zur Dehydrierung. Zur schrittweisen Einbettung der Proben in Polyembed (Merck, Darmstadt) wurden diese zwei mal 15 Minuten in Propylenoxid (Merck, Darmstadt), eine Stunde in Polyembed/Propylenoxid Gemisch (1:2), über Nacht in 1:1 Gemisch und eine Stunde in reinem Polyembed auf dem Rüttler verbracht. Die Proben mit dem Polyembed wurden in Flacheinbettformen gefüllt und im Wärmeschränk mindestens 18 Stunden bei 60°C belassen, um die vollständige Polymerisation des Kunststoffes zu gewährleisten.

Am Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung, Wien) wurden Semidünnschnitte von 1µm Dicke angefertigt und mit Methylenblau nach Richardson gefärbt. Nach lichtmikroskopischer Beurteilung der Semidünnschnitte wurden geeignete Bereiche ausgewählt, von denen Ultradünnschnitte (60nm) mit dem Ultracut E mittels eines speziellen Diamantmessers (Diatome, Biel, Schweiz) angefertigt wurden. Diese wurden auf Kupfergrids (150 Mesh, Polysciences, Eppelheim) aufgezogen und mit Uranylacetat (20 Minuten) und Bleicitrat nach Reynolds (3-5

Minuten) nachkontrastiert. Die Auswertung erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Zeiss, Oberkochen).

IV. ERGEBNISSE

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

1.1. Konventionelle Färbungen

Im Rahmen der lichtmikroskopischen, histologischen Untersuchungen wurden die konventionellen Färbungen HE, Goldner, van Gieson-Resorcinfuchsin, PAS und Alzianblau (pH 1 und pH 2,5) durchgeführt.

Tabelle 6: Konventionelle und substrathistochemische Färbungen am Ovar der Katze

	HE	Goldner	van Gieson-Resorcinfuchsin	PAS	Alzianblau pH 2,5	Alzianblau pH 1
ZK	blau	rotbraun	braun	blau/ violett	rosa	rosa
CP	rosa	ziegelrot	hellrot	hellblau	hellrosa	hellrosa
EZ:						
ZK	rosa	hellrot NC rot	hellrot NC dunkelbraun	hellblau	hellrosa	hellrosa
Oo	hell- rosa	hellrosa	beige	hellblau	hellrosa	hellrosa
ZP	rosa	grün	orange	violett- rot	kräftig blau	leicht blau
Fh	hell	hell	hell	hell	blau	leicht blau
GK/TD						
ZK	blau	rot	hellbraun	rosarot	rosa	rosa
CP	rosa	hellrot	beige	rosa	rosa	rosa

ZK = Zellkern, CP = Zytoplasma, EZ = Eizelle, Oo = Ooplasma, ZP = Zona pellucida, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, TD = Thekadrüsen

1.1.1. Ovargewebe

Die entnommenen Ovarien der Katzen sind zwischen 6 und 12mm lang und zwischen 4 und 8mm breit. Schon makroskopisch sind in der Regel bei den meisten Ovaranschnitten einige Tertiärfollikel oder Gelbkörper zu erkennen.

Bereits mit bloßem Auge kann eine Rinden- und Markzone unterschieden werden. Das Ovarmark besteht aus relativ locker angeordnetem Bindegewebe mit zahlreichen eingelagerten Blutgefäßen, Muskelfasern etc., im Gegensatz zu der kompakt erscheinenden Ovarrinde, in der sämtliche Funktionsgebilde enthalten sind. Bei der ersten mikroskopischen Untersuchung fallen in allen untersuchten Schnitten große Ansammlungen an Thekadrüsen auf. Die verschiedenen Follikelstadien vom Primordial- zum Tertiärfollikel sind in allen untersuchten Ovarien in unterschiedlicher Anzahl zu finden.

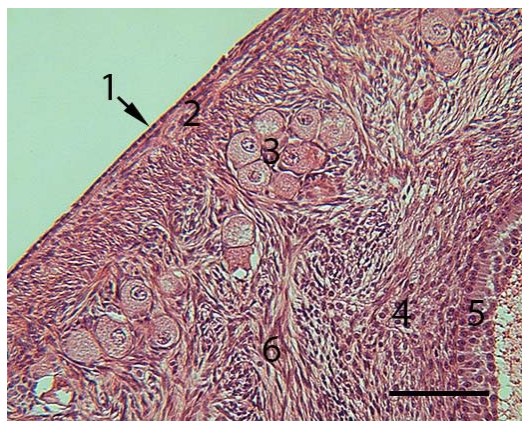


Bild 2: Ovar Katze, Ovarrinde, HE-Färbung

Unter dem Keimdrüsenepithel (1) befindet sich die Tunica albuginea (2). Daran anschließend liegen Ansammlungen von Primordialfollikeln (3) in der Ovarrinde. Der Rindenbereich ist deutlich zellreicher als der Markbereich.

4 = Thekazellen,
5 = Tertiärfollikelwand,
6 = spinozelluläres Bindegewebe

SB = 100µm

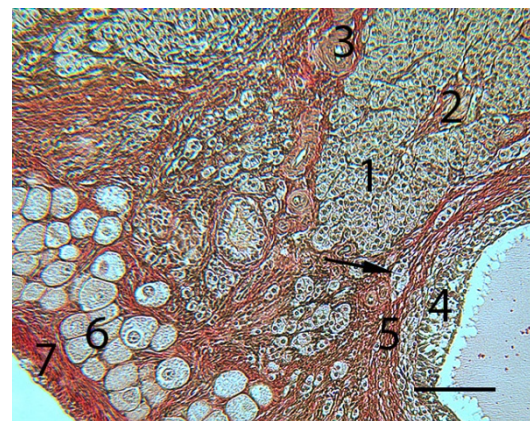


Bild 3: Ovar Katze, Übersicht, van Gieson-Resorcin-fuchsin-Färbung

Unter dem Keimdrüsenepithel liegt die bindegewebige Tunica albuginea (7). In der Ovarrinde befinden sich Ansammlungen von Primordialfollikeln (6). Im Lumen der Thekadrüsen (1) liegt Bindegewebe (2). Die aufgelockerten Granulosazellen (4) in der Wand des Tertiärfollikels sind ein Hinweis auf Atresie.

3 = Gefäß, 5 = Thekaschichten, Pfeil = Thekazelle

SB = 100µm

1.1.1.1. Thekadrüsen

Eine in allen untersuchten Ovarien vorkommende Struktur sind die interstitiellen Drüsen oder auch Thekadrüsen. Diese bestehen aus Thekazellen, Bindegewebe und zentral häufig auch aus PAS und Alzianblau (pH 2,5) positiven Substanzen. Sie sind durchschnittlich 300-600µm lang, kommen einzeln oder in Gruppen vor und befinden sich vorwiegend im Markbereich. Meistens sind sie von längsovaler Form und die einzelnen Thekazellen sind in konzentrisch angeordneten Strängen eingeschlossen. Zum umliegenden Gewebe wird die Thekadrüse durch eine dünne, bindegewebige Kapsel abgegrenzt. Im Zentrum der Drüse befindet sich immer Bindegewebe und bei einigen Drüsen auch PAS oder Alzianblau-positives Material, bei dem es sich um Reste der Zona pellucida handeln könnte. Die PAS-positiven Reaktionen können auch nach Methylierung und Amylasevorbehandlung weiterhin detektiert werden.

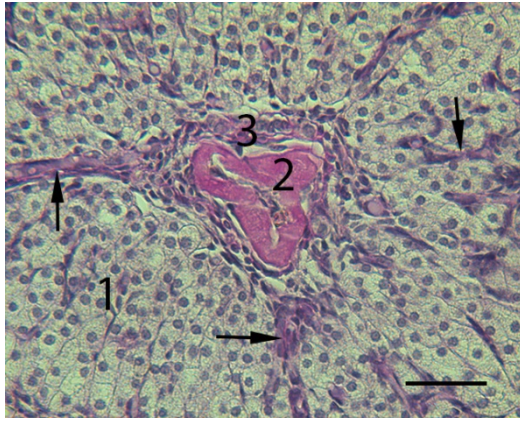


Bild 4: Ovar Katze, Gelbkörper, Zentrum der Thekadrüse, PAS-Färbung

Im Lumen sind PAS-positive Substanzen (2) zu erkennen, die ähnlich wie die Zona pellucida reagieren. Die Thekazellen (1) sind konzentrisch in Strängen angeordnet und durch bindegewebige Septen (Pfeile) unterteilt.

3 = Bindegewebe

SB= 40µm

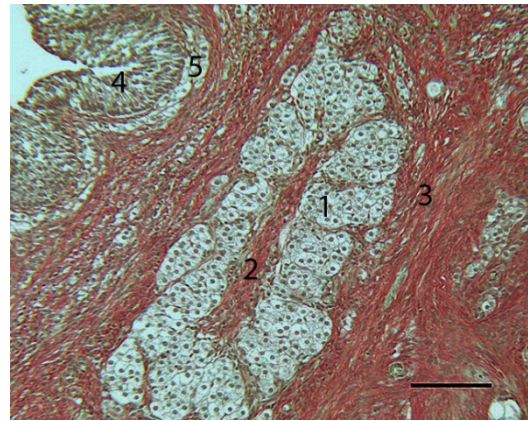


Bild 5: Ovar Katze, Thekadrüse, van Gieson-Resorcin-fuchsin-Färbung

Die Thekadrüse (1) enthält im Lumen kollagenes Bindegewebe (2).

3 = kollagenes Bindegewebe, 4 = Wand eines ovulierten Follikels, 5 = Thekazelle

SB = 100µm

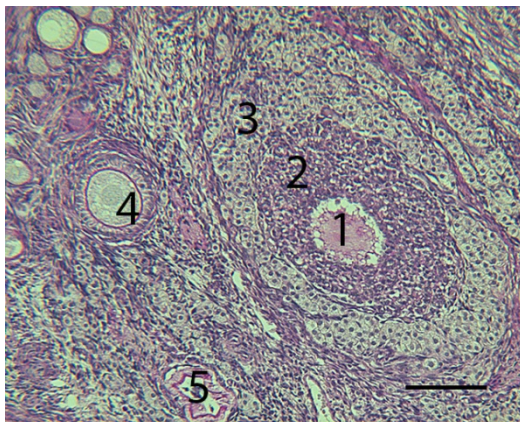


Bild 6: Ovar Katze, atretischer Follikel, PAS-Färbung

Im Lumen des atretischen Follikels sind noch PAS-positive Substanzen zu finden (1). An die Überreste der Granulosazellschicht (2) grenzen die aus der Theca interna stammenden hypertrophierten Thekazellen (3).

4 = Primärfollikel, 5 = atretischer Follikel

SB= 100µm

1.1.1.2. Gelbkörper

In einigen der untersuchten Proben waren ein oder mehrere Gelbkörper zu finden. Diese treten bei der Katze nur während der Trächtigkeit oder während eines Zyklus, in dem eine Ovulation, aber keine Fertilisation stattgefunden hat auf, da Katzen eine induzierte Ovulation aufweisen. Die Corpora lutea bestehen aus Granulosa- und Thekaluteinzellen, wobei sowohl PAS, als auch Alzianblau (pH 2,5) positive Substanzen zu finden waren. Die Granulosaluteinzellen sind zytoplasmareich und liegen zahlreich im Gelbkörper vor. Die Thekaluteinzellen sind deutlich kleiner und in Strängen zwischen den Granulosaluteinzellen angeordnet. Der Gelbkörper ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, die bei pH 2,5 eine deutlich positive Azianblaureaktion zeigt. Auch zwischen den Luteinzellen sind Bindegewebe und Blutgefäße zur Versorgung enthalten, die PAS-positive Substanzen enthalten. Die Größe der Corpora lutea variierte je nach Stadium erheblich. Es waren vor allem prominente Gelbkörper zu finden, die etwa die Hälfte des gesamten Ovargewebes ausmachten. Daneben waren auch deutlich kleinere Exemplare von etwa 300µm Durchmesser zu finden. Auch einige Restgelbkörper waren in den untersuchten Ovarien zu beobachten.

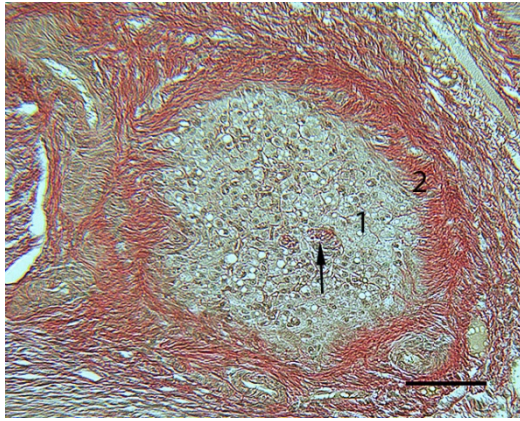


Bild 7: Ovar Katze, Gelbkörper in Rückbildung, van Gieson-Resorcin-fuchsin-Färbung

Es sind vorwiegend Granulosaluteinzellen (1) zu erkennen. Zentral befinden sich Blutgefäße (Pfeil).
2 = kollagene Fasern

SB = 100µm

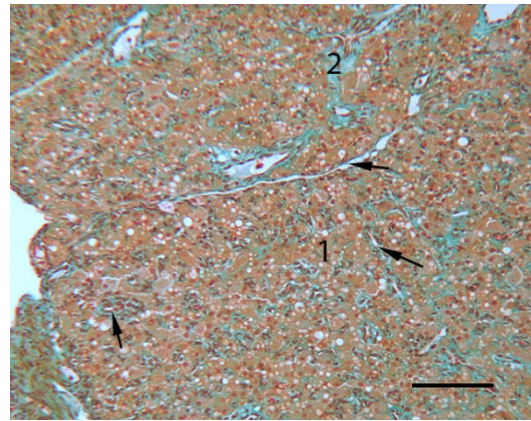


Bild 8: Ovar Katze, Gelbkörper, Goldner-Färbung

Der Gelbkörper besteht aus Luteinzellen (1) und dem dazwischen liegenden Bindegewebe (2). Auch verschiedene Blutgefäße (Pfeile) befinden sich darin.

SB = 100µm

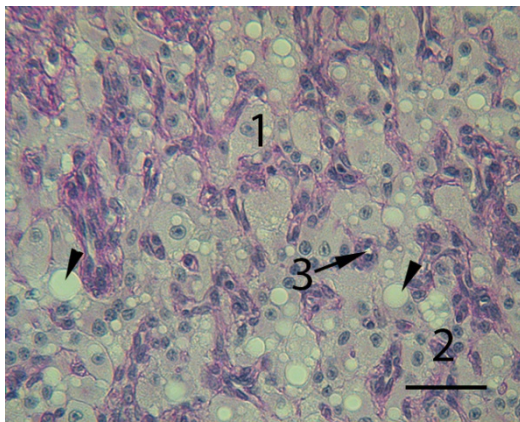


Bild 9: Ovar Katze, Gelbkörper, PAS-Färbung

Im Gegensatz zu den Thekaluteinzellen (2) besitzen die Granulosaluteinzellen (1) einen großen Zytoplasmaanteil. Im Zytoplasma sind zahlreiche Fetttröpfchen (Pfeile) zu erkennen.

3 = Gefäß

SB = 25 µm

1.1.1.3. Keimdrüsenepithel und Tunica albuginea

Der äußere Überzug des Eierstocks ist ein vorwiegend isoprismatisches, einschichtiges Epithel, das Keimdrüsenepithel. Es handelt sich dabei um ein sehr anpassungsfähiges, variables Epithel, das unterschiedliche Formen (flach bis hochprismatisch, teilweise auch mehrschichtig) aufweisen kann. Unter diesem befindet sich eine Basalmembran, an die die bindegewebige Tunica albuginea anschließt. Diese färbt sich in der van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung rot an, besteht also vorwiegend aus kollagenen Fasern. Die Tunica albuginea enthält auch Alzianblau-positive Substanzen (bei pH 2,5). Sie ist eine relativ zellreiche Schicht und wirkt bei mikroskopischer Betrachtung sehr kompakt.

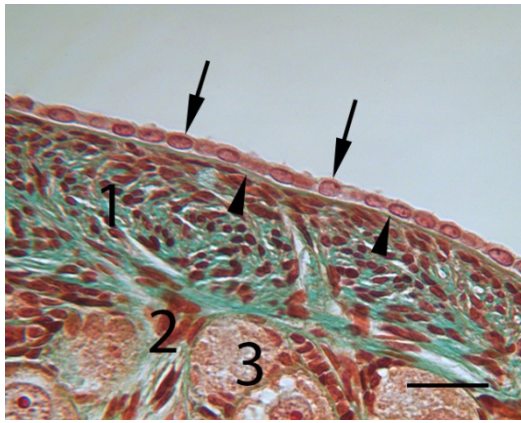


Bild 10: Ovar Katze, Keimdrüsenepithel, Goldner-Färbung

Das Keimdrüsenepithel (Pfeile) stellt sich meist isoprismatisch bis flach dar. Darunter liegt die bindegewebige Tunica albuginea (1), an die sich spinozelluläres Bindegewebe (2) der Ovarrinde anschließt.
3 = Primordialfollikel
Pfeilspitzen = Basalmembran

SB= 25µm

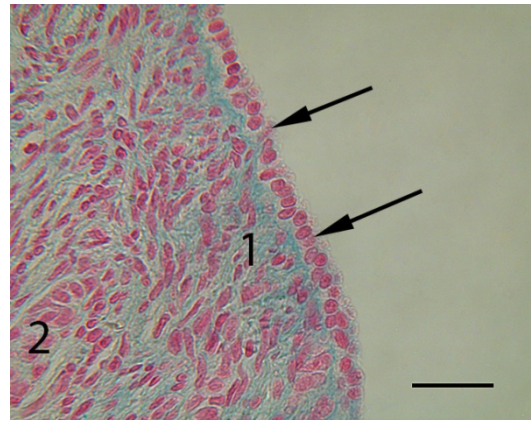


Bild 11: Ovar Katze, Ovarrinde mit Keimdrüsenepithel, Alzianblau pH 2,5

Unter dem isoprismatischen, einschichtigen Keimdrüsenepithel (Pfeile) liegt die bindegewebige Tunica albuginea (1), die Alzianblau-positive Substanzen enthält.
2 = Thekazellen

SB = 25µm

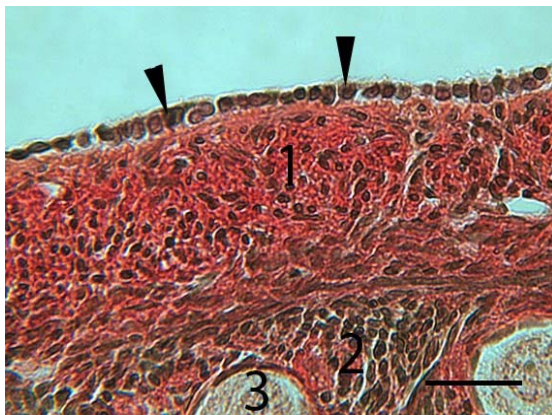


Bild 12: Ovar Katze, Ovarrinde mit Keimdrüsenepithel, van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung

Das Keimdrüsenepithel (Pfeilspitzen) ist kubisch und die Zellen haben nur einen geringen Zytoplasmaanteil.
Die Tunica albuginea (1) besteht vorwiegend aus kollagenen Fasern und Fibrozyten.
2 = spinozelluläres Bindegewebe,
3 = Primordialfollikel

SB = 25 µm

1.1.1.4. Rete ovarii

Der intraovarielle Anteil des Rete ovarii war nur in wenigen der untersuchten Schnitte zu finden. Es ist meist von einem kubischen Epithel ausgekleidet. Darunter ist eine Basalmembran gelegen, die das Epithel von dem kollagenen und lockeren darunter liegenden Bindegewebe trennt. In diesem sind auch einige Arterien und Venen enthalten. Die Höhe des Epithels nimmt vom intraovariellen zum konnektiven Rete zu. In der PAS-Färbung sind manchmal PAS-positive Substanzen im Lumen oder im apikalen Bereich der Epithelzellen zu erkennen, die Hinweise für eine sekretorische Aktivität des Rete geben können. Diese Reaktionen können auch nach Amylasevorbehandlung oder Methylierung weiterhin detektiert werden.

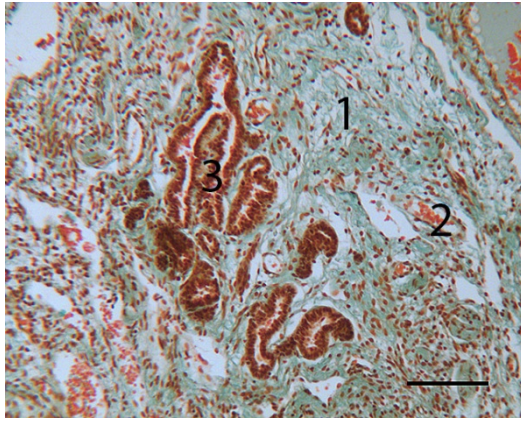


Bild 13: Ovar Katze, konnektives Rete, Goldner-Färbung

Das Rete (3) weist in diesem Bereich ein hochprismatisches, mehrschichtiges Epithel auf. Es sind mehrere Anschnitte des tubulären Netzwerks, eingebettet in lockeres Bindegewebe (1) zu erkennen.
2 = Blutgefäß mit Erythrozyten

SB = 100 μ m

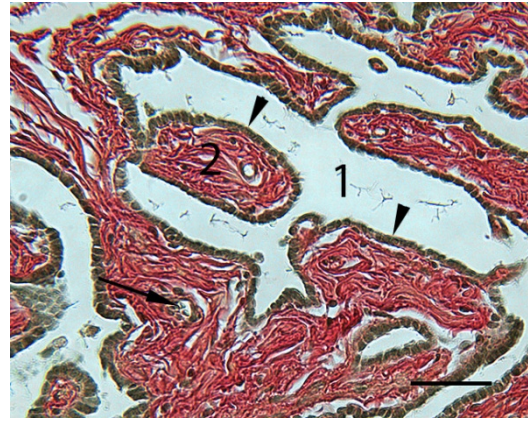


Bild 14: Ovar Katze, Rete ovarii, van Gieson-Resorcin-fuchsin-Färbung

Das Rete weist ein isoprismatisches Epithel (Pfeilspitzen) auf. Das darunterliegende kollagene Bindegewebe (2) enthält auch Blutgefäße (Pfeil).

1 = Lumen des Rete ovarii

SB = 40 μ m

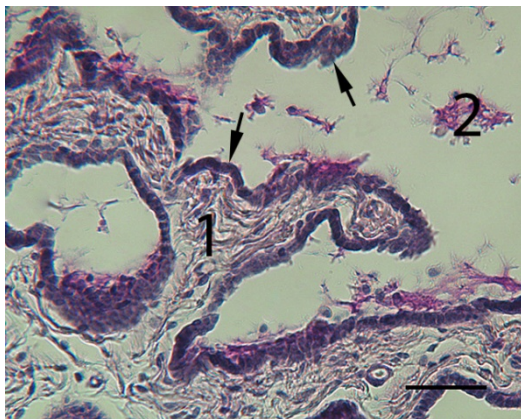


Bild 15: Ovar Katze, Rete ovarii, PAS-Färbung

Auf dem ein- bis mehrschichtigen isoprismatischen Epithel (Pfeil) sind PAS-positive Substanzen aufgelagert. Diese sind auch im Lumen (2) zu finden.

1 = stromales Bindegewebe

SB = 40 μ m

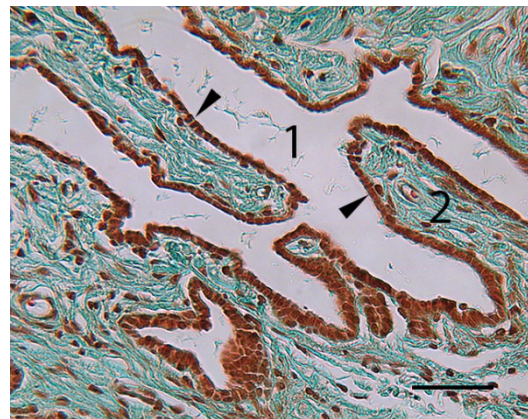


Bild 16: Ovar Katze, Rete ovarii, Goldner-Färbung

Das intraovarielle Rete besitzt ein einschichtiges isoprismatisches Epithel (Pfeilspitzen).

1 = Lumen, 2 = stromales Bindegewebe

SB = 40 μ m

1.1.2. Funktionsgebilde auf dem Ovar

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung finden sich Follikel verschiedener Stadien in den Ovarien der Katzen.

1.1.2.1. Primordialfollikel

In allen Proben befinden sich Primordialfollikel unterschiedlicher Anzahl in der Rinde des Ovars. In den Proben der jüngeren Katzen sind deutlich mehr Primordialfollikel als bei Katzen über fünf Jahren vorhanden. Diese sind bei den jungen Tieren in kleinen Gruppen zusammengelagert. In Ovarien älterer Tiere liegen die Primordialfollikel nur vereinzelt in der Rinde vor. Ihr Durchmesser beträgt durchschnittlich etwa 20-30µm und sie bestehen aus der Eizelle und dem sie umgebenden flachen, einschichtigen Follikelepithel. Das Ooplasma wirkt homogen und der große, euchromatinreiche Nukleus enthält häufig ein dunkel angefärbtes Kernkörperchen (Nukleolus). Die Basalmembran, die den Follikel gegenüber dem Ovarialstoma abgrenzt, färbt sich in der Goldnerfärbung grün an und enthält auch PAS-positive Substanzen.

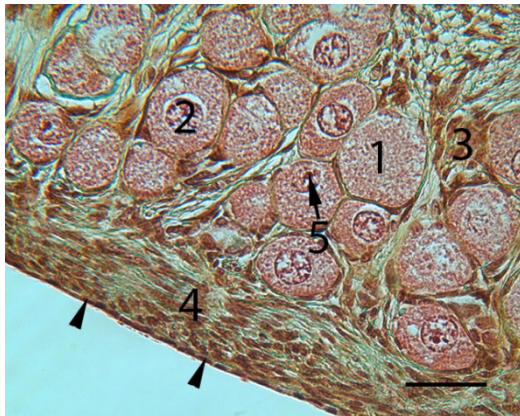


Bild 17: Ovar Katze, Ovarrinde, Goldner-Färbung

In der Ovarrinde liegen unterhalb der Tunica albuginea (4) Ansammlungen von Primordialfollikeln (1). Diese enthalten einen großen Nukleus (2) mit einem dunklen Kernkörperchen (5). Das die Eizelle umgebende Follikelepithel besteht aus flachen einschichtigen Granulosazellen und eine Basalmembran (Pfeil) grenzt den Follikel vom darunterliegenden Gewebe ab. 3 = Bindegewebe (BGW), Pfeilspitzen = Keimdrüsenepithel

SB= 40µm

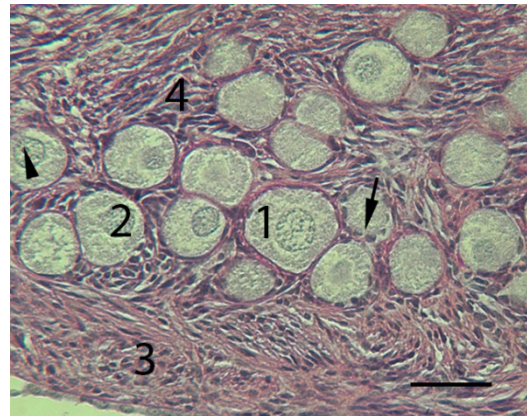


Bild 18: Ovar Katze, Ovarrinde mit Primordialfollikel, PAS-Färbung

Die Primordialfollikel (1) sind von einem einschichtigen flachen Follikelepithel (Pfeil) umgeben. In der daran anschließenden Basalmembran sind auch PAS-positive Substanzen erkennbar. 2 = Nukleus, 3 = Tunica albuginea, Pfeilspitze = Nukleolus, 4 = Fibrozyten

SB = 40µm

1.1.2.2. Primärfollikel

Auch Primärfollikel liegen in allen untersuchten Ovarien vor. Sie unterscheiden sich morphologisch von den Primordialfollikeln durch ihr einschichtiges iso- bis hochprismatisches Follikelepithel. Diese Follikel sind im Durchschnitt 40-50µm groß. Sie kommen deutlich seltener im Ovar vor als die z.T. in großen Ansammlungen zu findenden Primordialfollikeln (vor allem bei den Tieren unter fünf Jahren, die große Ansammlungen an Primordialfollikeln in der Ovarrinde enthalten). Da sie durch Wachstum von Oozyte und Zunahme der Granulosazellen entstehen, kann man z.T. Mitosefiguren in den Follikelepithelzellen erkennen. Das Ooplasma ist vorwiegend homogen, erhält manchmal auch lichtmikroskopisch erkennbare Vakuolen. Häufig ist ein dunkles Kernkörperchen im etwa 10-15µm großen Nukleus zu erkennen. In der PAS Färbung erkennt man schon deutlich eine zwischen Eizelle und Follikelepithel befindliche Schicht mit PAS-positiven Substanzen als beginnende Bildung der Zona pellucida. Diese ist bei der PAS-Kontrollreaktion (Amylasevorbehandlung, Acetylierung oder Methylierung) nicht mehr nachweisbar. Die Granulosazellen sind isoprismatisch und gleichmäßig, einschichtig um die Eizelle herum angeordnet. Daran schließt nach außen die Basalmembran als Abgrenzung zum umliegenden Gewebe an.



Bild 19: Ovar Katze, Primär- und Primordialfollikel, PAS-Färbung

In diesem Bild der Ovarrinde befinden sich Primordialfollikel (1) und ein Primärfollikel. Dieser besteht aus der Eizelle mit dem homogen erscheinenden Ooplasma (4) und dem euchromatinreichen Nukleus (5) mit Kernkörperchen (Pfeil). Das Follikelepithel (3) ist einschichtig isoprismatisch. Zwischen den Granulosazellen und der Oozyte ist eine Schicht PAS positiver Substanzen zu erkennen.

2= Thekazellen

SB= 40µm

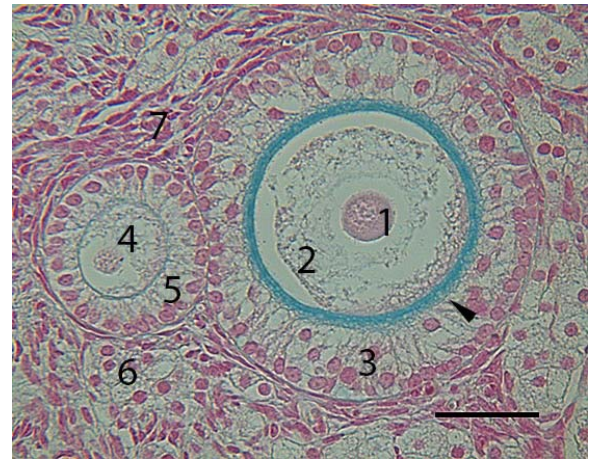


Bild 20: Ovar Katze, Primär- und Sekundärfollikel, Alzianblau pH 2,5

Ein Primärfollikel (4) mit einschichtigen iso- bis hochprismatischen Granulosazellen (5) liegt neben einem atretischen Sekundärfollikel. In dem Ooplasma (2) färbt sich der Nukleus (1) etwas deutlicher an. Das Follikelepithel (3) teilt sich und wird mehrschichtig. Zwischen diesem und der Eizelle befindet sich eine deutliche blau angefärbte Zona pellucida (Pfeil). Auch bei dem Primärfollikel ist bereits eine dünne blaue Schicht zu erkennen.

6 = Thekazellen, 7 = spinozelluläres BGW

SB = 40µm

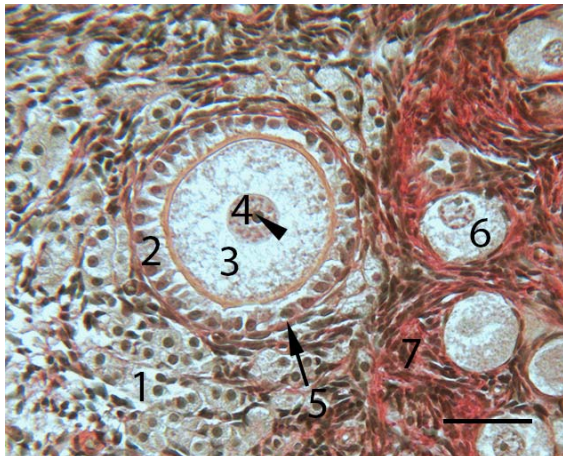


Bild 21: Ovar Katze, Primär- und Primordialfollikel, van Gieson-Resorcin-fuchsin-Färbung

Die in der Ovarrinde gelegenen Primordialfollikel (6) zeigen häufig ein deutliches Kernkörperchen (Pfeilspitze). Der Nukleus (4) des Primärfollikels ebenfalls. Zwischen dem einschichtigen Follikelepithel (2) und der Eizelle (3) ist eine deutliche Zona pellucida (Pfeil) zu erkennen. Zum umliegenden Bindegewebe wird der Follikel durch eine Basalmembran (5) abgegrenzt.

1 = Thekazellen, 7 = spinozelluläres BGW

SB = 40 µm

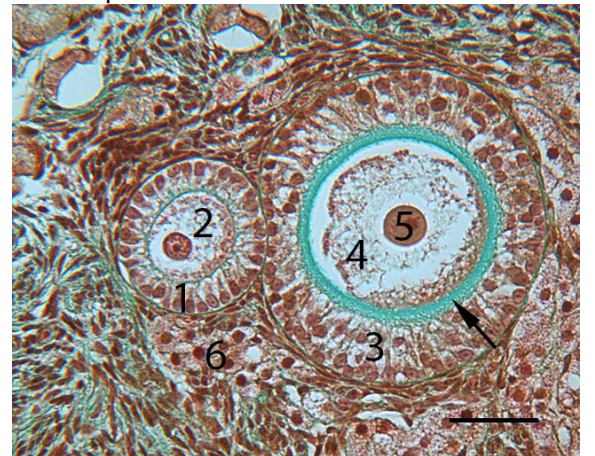


Bild 22: Ovar Katze, Primär- und Primordialfollikel, Goldner-Färbung

Primär- (2) und atretischer Sekundärfollikel. Die Zona pellucida (Pfeil) ist im Sekundärfollikel gut ausgebildet. Auch beim Primärfollikel ist bereits ein dünner grüner Saum erkennbar (Pfeilspitze).

1 = einschichtiges Follikelepithel,

3 = mehrschichtiges Follikelepithel,

4 = Ooplasma, 5 = Nukleus mit Kernkörperchen,

6 = Thekazellen

SB = 40µm

1.1.2.3. Sekundärfollikel

Die Zahl der Sekundärfollikel ist deutlich geringer als die der früheren Follikelstadien. Die Eizelle ist erheblich gewachsen, hat einen deutlichen Nukleolus und das Follikelepithel wird mehrschichtig iso- oder hochprismatisch. Im Schnitt sind die Follikel, die sich eindeutig als Sekundärfollikel ansprechen lassen, zwischen 100 und 200µm groß. Die Zona pellucida ist deutlich erkennbar zwischen Eizelle und Follikelepithel und bis zu 10µm dick. In der PAS-Färbung ist sie deutlich violett-rot und nach Amylasevorbehandlung in den größeren Follikeln negativ, ebenso wie nach Acetylierung. Nach Methylierung erscheint die Zona pellucida weiterhin PAS positiv, allerdings sind nach dieser Vorbehandlung nur bei den Sekundär und Tertiärfollikeln PAS positive Substanzen um die Eizelle zu erkennen. Bei der Alzianblau-Färbung färbt sich die Zona pellucida bei pH 2,5 intensiv blau an, wohingegen bei pH 1 nur eine schwache Blaufärbung zu erkennen ist. In der Goldner-Färbung stellt sich die Zona pellucida grün dar, bei der van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung ist sie orange. Sie lässt sich bereits lichtmikroskopisch in eine dünnere, kompakt erscheinende innere Schicht und eine etwas dickere, aufgelockerte äußere Schicht unterteilen. In den Granulosazellen sind weiterhin zahlreiche Mitosefiguren zu beobachten, was auf weiteres Wachstum des Follikels hinweist. Je nach Entwicklungsstadium des Sekundärfollikels sind z.T. schon Hohlräume zwischen den Granulosazellen zu erkennen. Diese zeigen häufig PAS oder Alzianblau positive Reaktionen. In den späten Stadien der Sekundärfollikel ist bereits eine Differenzierung des umliegenden Gewebes in die Thekaschichten andeutungsweise zu erkennen. In den Granulosazellen sind häufig Mitosefiguren zu beobachten. Zwischen den Follikelzellen bilden sich Hohlräume, die in vivo mit Liquor folliculi gefüllt sind. Sobald ein zusammenhängender Hohlraum entstanden ist, der im Folgenden als Antrum folliculi bezeichnet wird, wird der Follikel als Tertiärfollikel bezeichnet.

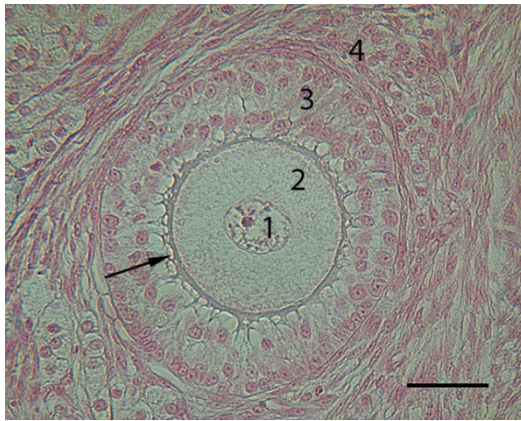


Bild 23: Ovar Katze, Sekundärfollikel, Alzanblau pH 1

Das Ooplasma (2) des Sekundärfollikels erscheint homogen und der euchromatinreiche Nukleus (1) besitzt einen deutlich ausgebildeten Nukleolus. Das Follikelepithel (3) ist mehrschichtig iso- bis hochprismatisch. In dem den Follikel umschließenden Bindegewebe beginnt die Bildung der Thekaschichten (4). Die Zona pellucida (Pfeil) ist nur ganz zart blau und es sind zahlreiche Ausläufer in Richtung der Granulosazellen zu erkennen.

SB= 40µm

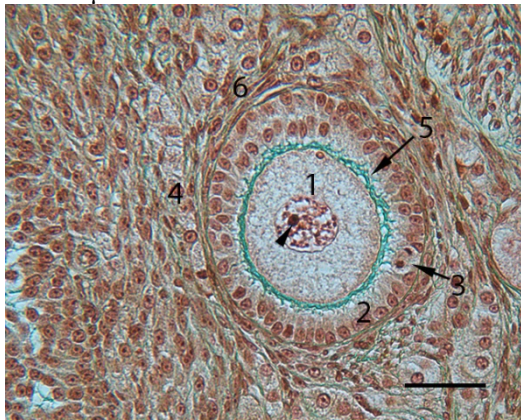


Bild 25: Ovar Katze, früher Sekundärfollikel, Goldner-Färbung

Das Follikelepithel (2) ist noch nicht in allen Bereichen zweischichtig. Der Follikel geht durch Wachstum der Eizelle (1) und Teilung der Granulosazellen (3) in einen Sekundärfollikel über. Die Zona pellucida (5) erscheint aufgelockert und es sind Ausläufer zu den umliegenden Zellen zu erkennen. Pfeilspitze = Nukleolus, 3 = Mitose zweier Granulosazellen, 4 = Thekazellen, 6 = Bindegewebe

SB = 40µm



Bild 24: Ovar Katze, Sekundärfollikel, PAS-Färbung

Dieser Sekundärfollikel zeigt bereits eine beginnende Antrumbildung (4). Die Abstände der Granulosazellen (3) erweitern sich und es entstehen mehrere Hohlräume. Die Zona pellucida ist deutlich PAS-positiv und zeigt in Richtung des Follikelepipithels zahlreiche Fortsätze (Pfeil). Auch die den Follikel umgebende Basalmembran (Pfeilspitze) enthält PAS-positive Substanzen.

1 = Nukleus, 2 = Ooplasma, 5 = beginnende Thekaschichten

SB = 40µm



Bild 26: Ovar Katze, Sekundärfollikel, HE-Färbung

Bei diesem Sekundärfollikel kann man schon deutlich die verschiedenen Granulosazellschichten (2) unterscheiden. Direkt an der Basalmembran, die den Follikel zum angrenzenden Bindegewebe (3) abgrenzt, liegen die basalen Granulosazellen. Um die Eizelle (1) herum, an die Zona pellucida (Pfeilspitze) angrenzend, beginnt sich die Corona radiata zu bilden. 4 = Thekazellen, Pfeil = beginnende Antrumbildung mit Zona pellucida ähnlichem Material

SB = 40µm

1.1.2.4. Tertiärfollikel

Der Tertiärfollikel entsteht durch weiteres Wachstum und Erweiterung des Abstandes zwischen Follikelepithel und Eizelle. Sie sind vorwiegend im Bereich der Rinde zu finden. Durch starke Vergrößerung der Follikelhöhle befindet sich die bis zu 150µm große Oozyte exzentrisch am Rand der Follikelhöhle in einer Ansammlung von Granulosazellen, die als Cumulus oophorus benannt wurde und so zum Verlust der symmetrischen Struktur führt. Ihre Größe variiert stark, es wurden Follikel von 200-2500µm untersucht. Der Follikel wächst deutlich durch Zunahme der Granulosazellen und des Liquor folliculi. Das Ooplasma ist homogen und manchmal vakuolisiert. Der weiterhin euchromatinreiche Nukleus hat einen häufig deutlich ausgebildeten Nukleolus. Zwischen den Granulosazellen bildet sich ein deutliches Antrum folliculi aus, welches mit Liquor folliculi gefüllt ist. Dieses färbt sich bei manchen Follikeln bei Alzianblau pH 2,5 stark blau an. Andere Follikel hingegen zeigen keine Alzianblau-positiven Substanzen im Antrum.

Durch die erhebliche Größenzunahme des Follikels im Verhältnis zur Eizelle sind viele Tertiärfollikelanschnitte ohne Anschnitt einer Eizelle zu finden. Das an den Follikel angrenzende Gewebe bildet eine deutliche Theca interna aus Fibrozyten und zahlreichen Thekazellen sowie Gefäßen, und eine Theca externa aus Fibrozyten, Fibroblasten, kollagenen Fasern, Gefäßen und Nerven. Deren genaue Abgrenzung voneinander ist nicht immer eindeutig möglich. Ist der Anschnitt einer Oozyte zu finden, befindet sich diese nicht mehr zentral, sondern liegt der Follikelhöhle am Rand an. Die Eizelle ist umgeben von einer deutlichen PAS und Alzianblau-positiven Zona pellucida und dem die Eizelle umschließenden Follikelepithel. Die Zona pellucida lässt sich in eine der Eizelle anliegende kompakte Schicht und eine nach außen anschließende eher locker erscheinende Schicht unterscheiden. Die Follikelepithelzellen bilden zum einen die Innenauskleidung des Antrum folliculi, als mehrschichtig hochprismatisches Epithel, zum anderen umschließen sie direkt die Eizelle mit einem iso- bis hochprismatischen mehrschichtigen Epithel, als Corona radiata. Auch in den lichtmikroskopischen Färbungen kann man Ausläufer der Corona radiata in die Zona pellucida erkennen. Die Zona pellucida wirkt in ihrem äußeren Bereich aufgelockert, im Gegensatz dazu stellt sich der innere Anteil homogen und kompakt dar.



Bild 27: Ovar Katze, Tertiärfollikel, Goldner-Färbung

Die Oozyte enthält einen großen Nukleus (1) und im Ooplasma (2) sind zahlreiche Vakuolen (Pfeilspitzen) zu finden. Die Zona pellucida (3) ist im inneren Teil kompakt, im äußeren Bereich eher locker. Die Follikelepithelzellen der Corona radiata (4) weisen zahlreiche Mitosefiguren auf (Pfeile). 5 = Antrum folliculi, 6 = Granulosazellschicht im Bereich des Cumulus oophorus

SB = 40 µm

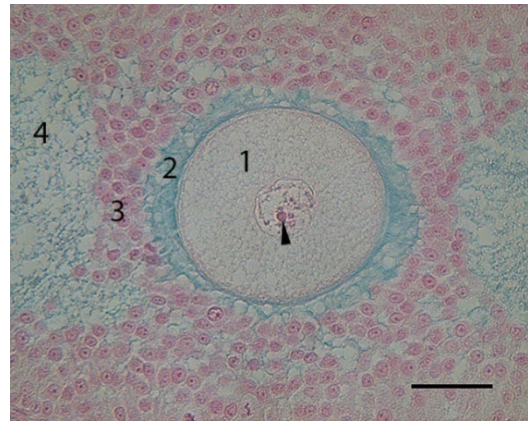


Bild 28: Ovar Katze, Sekundärfollikel Übergang zum Tertiärfollikel, Alzianblau pH 2,5

Die Zona pellucida (2) enthält Alzianblau-positive Substanzen und es sind Ausläufer zu den Granulosazellen (3) zu erkennen. 1 = Ooplasma, 4 = Antrum folliculi, Pfeilspitze = Kernkörperchen

SB = 40µm



Bild 29: Ovar Katze, früher Tertiärfollikel, PAS-Färbung nach Amylase-Vorbehandlung

Nach Amylasevorbehandlung reagiert die Zona pellucida (2) nicht mehr PAS-positiv. In der Corona radiata (3) und in den umliegenden Granulosazellen sind einige Mitosen (Pfeile) zu erkennen. 1 = Ooplasma, 4 = Antrum folliculi, Pfeilspitze = Kernkörperchen

SB = 40µm

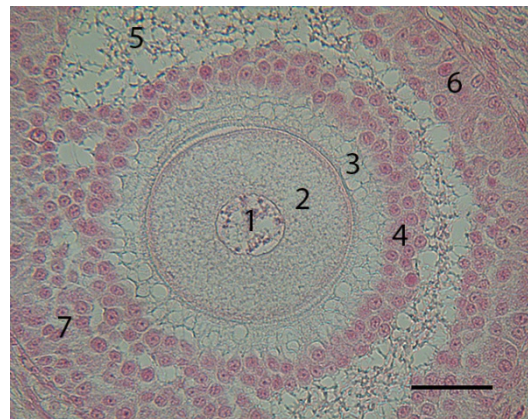


Bild 30: Ovar Katze, Tertiärfollikel, Alzianblau pH 1

Der große Nukleus (1) liegt zentral im homogenen Ooplasma (2). Die die Eizelle umschließende Zona pellucida (3) ist bei pH 1 kaum noch blau. 4 = Corona radiata, 5 = Antrum folliculi, 6 = Granulosazellschicht, 7 = Cumulus oophorus

SB = 40µm

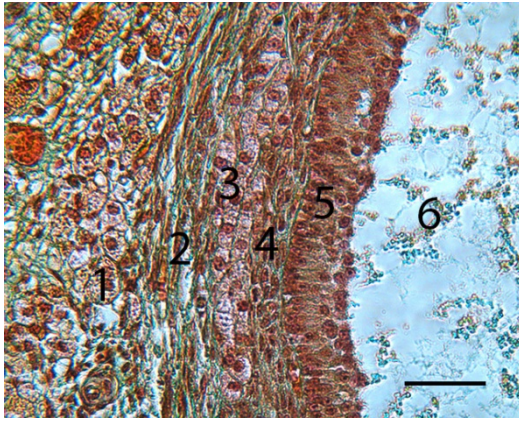


Bild 31: Ovar Katze, Follikelwand eines Tertiärfollikels, Goldner-Färbung

An die Follikelhöhle (6) schließt die Granulosazellschicht (5) an. Durch die Basalmembran abgegrenzt folgt die Theca interna (4) mit den darin liegenden Thekazellen (3). Nach außen folgt die bindegewebige Theca externa (2) mit Gefäßen.

1 = Thekazellen

SB = 40 µm

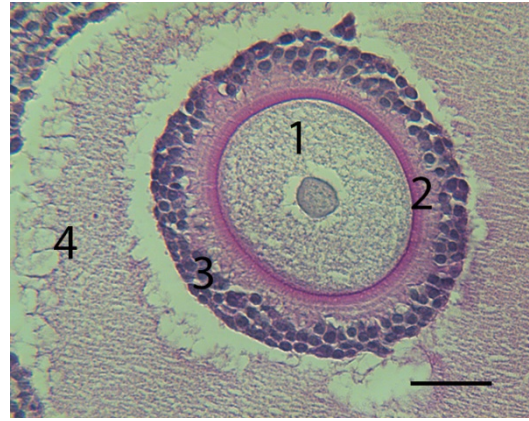


Bild 32: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PAS-Färbung

Die Eizelle (1) ist von der Zona pellucida (2) und der daran anschließenden Corona radiata (3) umgeben. Die ZP wirkt im inneren Teil homogen und deutlich PAS-positiv gefärbt, der äußere Teil ist eher locker und weniger stark angefärbt.

4 = Antrum folliculi

SB = 40µm

1.1.2.5. Polyoozytäre Follikel

In allen Follikelstadien vom Primordial- bis zum frühen Tertiärfollikel lassen sich auch vereinzelt polyoozytäre Follikel nachweisen, also Follikel, in denen mehr als eine Eizelle vorhanden sind. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Zellmorphologie nicht von den Follikeln, die nur eine Eizelle enthalten. Die Oozyten können gleich groß sein, oder auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien vorliegen. Insgesamt waren in den 42 lichtmikroskopisch untersuchten Ovarien von 21 Tieren 28 polyoozytäre Follikel. In dieser Untersuchung wurden Follikel mit bis zu drei Eizellen gefunden.



Bild 33: Ovar Katze, polyoozytärer Tertiärfollikel, HE-Färbung

Dieser Tertiärfollikel besitzt zwei gleichgroße Eizellen (2), die jeweils einen eigenen Cumulus oophorus (3) sowie eine Corona radiata besitzen. Sonst gleicht er morphologisch den monoozytären Follikeln. Im umliegenden Gewebe bilden sich die Thekaschichten (4) und es ist ein einheitlicher Hohlraum, das Antrum folliculi (1) entstanden.

SB= 100µm

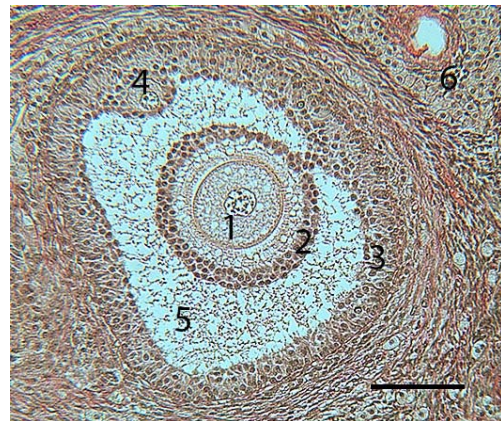


Bild 34: Ovar Katze, polyoozytärer Tertiärfollikel, van Gieson-Resorcin-fuchsin-Färbung

Der polyoozytäre Tertiärfollikel enthält zwei unterschiedlich große Oozyten. Eine (1) die diesem Stadium entspricht, etwa 100µm Durchmesser, eine ausgebildete Zona pellucida und umliegende Corona radiata (2). Die zweite Eizelle (4) ist deutlich kleiner (30µm), besitzt keine Zona pellucida und ist vollständig von Granulosazellen umschlossen.

3 = Granulosazellschicht, 5 = Antrum folliculi, 6 = Thekadrüse

SB = 100µm

1.1.2.6. Atretische Follikel

Einige der untersuchten Follikel verschiedener Stadien waren atretisch. Die am häufigsten vorkommenden Hinweise auf Atresie bieten die Überreste der Zona pellucida. Da die Zona pellucida der Follikel am schwersten abzubauen ist, bleibt sie am längsten bestehen. In allen untersuchten Proben finden sich zahlreiche kollabierte Reste der Zona pellucida. In der PAS-Färbung reagieren diese positiv, auch nach Methylierung und Amylasevorbehandlung. Im Gegensatz dazu reagiert die Zona pellucida der meisten Sekundär- und Tertiärfollikel nach Amylasevorbehandlung nicht mehr PAS-positiv. Neben den Resten der Zona pellucida sind auch Follikelhöhlen atretischer Tertiärfollikel zu finden. Die Granulosazellschicht wird häufig lockerer und unregelmäßig, die umliegenden Thekazellen nehmen zu. In einem späteren Stadium sind auch in die Follikelhöhle eingewanderte Zellen zu finden. Diese haben in einem fortgeschrittenen Stadium oft morphologische Ähnlichkeit mit den Thekadrüsen. Zwischen den Zellen sind Alzianblau- und PAS-positive Substanzen eingelagert und auch Bindegewebszellen sowie Gefäße zu finden. Auch bei präantralen Follikeln gibt es Hinweise auf eine bevorstehende oder bereits begonnene Atresie. Es bilden sich häufig Vakuolen im Zytoplasma und zwischen Ooplasma und Granulosazellen ist manchmal ein Spalt zu erkennen, der durch Schrumpfung entsteht. Der Nukleus verliert häufig auch seine zentrale Position und seine regelmäßige Form. Sofern vorhanden, legt sich die Zona pellucida in Falten. Die Falten entstehen durch die geschrumpfte Eizelle.

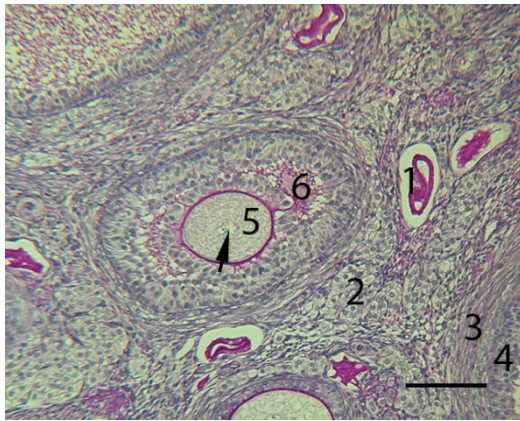


Bild 35: Ovar Katze, Markbereich, PAS-Färbung

Bei dem frühen antralen Follikel sind PAS positive Substanzen an der Zona pellucida und im Antrum (6) zu erkennen. Bei den umliegenden atretischen Follikeln (1) sind nur noch Reste der ZP zu erkennen.
2 = Thekazellen, 3 = Thekaschichten eines Tertiärfollikels, 4 = Granulosazellschicht, 5 = Oozyte, Pfeil = Nukleus

SB= 100µm

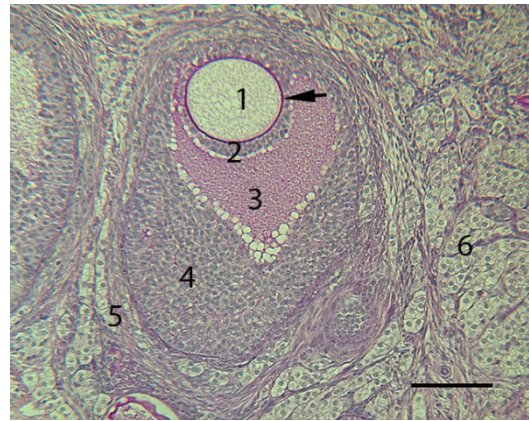


Bild 36: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PAS-Färbung

Das Antrum (3) des Tertiärfollikels nimmt durch die massive Verdickung der Granulosazellschicht (4) ab. Um die im Ooplasma deutlich vakuolisierte Oozyte (1) folgen direkt an die Zona pellucida (Pfeil) die Zellen der Corona radiata (2).
5 = Thekaschichten, 6 = Thekazellen

SB = 100µm

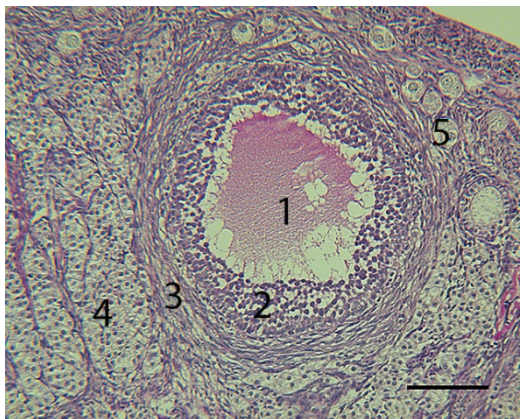


Bild 37: Ovar Katze, atretischer Tertiärfollikel, PAS-Färbung

Die Granulosazellschicht (2) des in Atresie befindlichen Tertiärfollikels (1) ist aufgelockert und unregelmäßig.
3 = Thekaschichten, 4 = Thekadrüsen, 5 = Primordialfollikel

SB = 100 µm

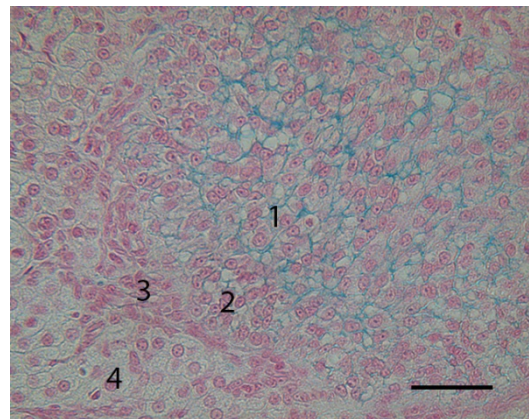


Bild 38: Ovar Katze, atretischer Tertiärfollikel, Alzianblau pH 2,5

Im Bereich des ehemaligen Lumens (1) sind Thekazellen eingewandert und hypertrophiert, zwischen denen Alzianblau-positive Substanzen zu erkennen sind. Reste der Granulosazellschicht (2) sowie der Thekaschichten (3) sind zu erkennen.
4 = Thekazellen

SB = 40µm

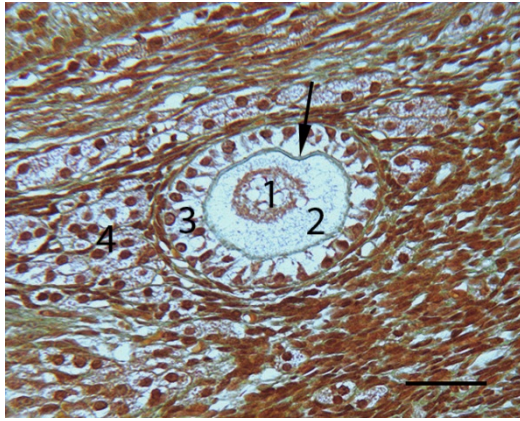


Bild 39: Ovar Katze, atretischer Primärfollikel, Goldner-Färbung

Sowohl der Nukleus (1), als auch das Ooplasma (2) des Primärfollikels weist eine deutliche Vakuolisierung auf. Die Zona pellucida (Pfeil) ist eingefaltet und beginnt sich von den Granulosazellen (3) abzuheben.

Um den Follikel sind Ansammlungen an Thekazellen (4) zu erkennen.

SB = 40 μm

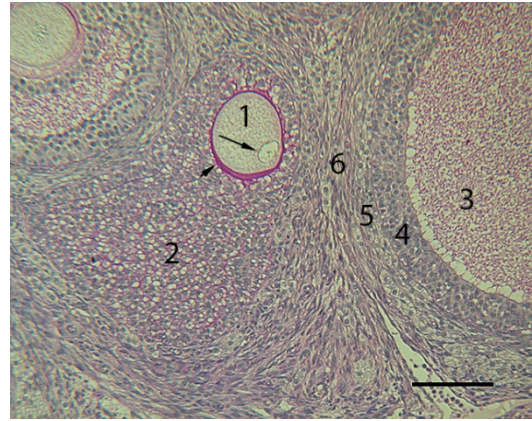


Bild 40: Ovar Katze, atretischer Follikel, PAS-Färbung

Die Follikelhöhle des atretischen Follikels ist bereits vollständig von eingewanderten Zellen (2) ausgefüllt. Dazwischen befinden sich PAS-positive Substanzen. Die Eizelle (1) ist nicht mehr regelmäßig geformt und der Nukleus (Pfeil) liegt exzentrisch.

Pfeilspitze = Zona pellucida,

3 = Follikelhöhle,

4 = Granulosazellschicht,

5 = Theca interna, 6 = Theca externa

SB = 100 μm

1.2. Glykohistochemische Untersuchungen

	Con A	WGA	WGAs	PSA	RCA	PHA E	PHA L	GSA I	VAA	MAA I	SNA	SJA
Ges:	++	+++	++	+	-(+)	+	-	-	- (+)	-	++	-
Primordial-follikel												
BSM	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oo	++ Gr	+- Gr	-	+- Gr	-	-	-	-	-	-	+ Gr	-
GZ	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Primärfollikel												
BSM	-	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oo	+-	+-	-	+- Gr	-	-	-	-	-	-	-	-
GZ	+	+-	+-	+-	-	-	-	-	-	-	+ Gr	-
Sekundär-follikel												
BSM	+-	+	+	-	-	+-	-	-	-	-	-	-
ZP	+-	+++	++	-	-	+-	-	-	-	-	+- (innen)	-
Oo	++	-	-	+- Gr	-	-	-	-	-	-	-	-
GZ	++	+	+-	+-	+-	+-	-	-	-	-	+	-
Fh	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tertiärfollikel												
BSM	+-	+	+	-	-	+-	-	-	-	-	+	-
ZP	+-	+++	++	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Oo	+	-	-	+- Gr	-	-	-	-	-	-	-	-
GZ	++	+	+-	+-	+-	+-	-	-	+-	-	++	-
Fh	-	++	++	- (+)	-	+-	-	-	-	-	++	-
Ti	+	+	+-	+-	-	+	-	-	+	-	+-	-
Te	+-	++	+-	+-	-	+-	-	-	-	-	+-	-
CR	++	++	+	-	+-	+-	-	-	+-	-	+++	-
Gelbkörper												
GL	++	+-Gr	-	+-	+-	+-	-	-	+	-	++ Gr	-
TL	+	+-	+-	++	-	-	-	-	-	-	+-	-
BG	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGW	+-	+-	+-	+	-	+-	-	-	-	-	+	-
Weiteres Gewebe												
BGW	+-	+-	+-	+	-	+-	-	-	-	-	++	-
BGWZ	+-	-	-	+-	-	+-	-	-	-	-	+-	-
BG	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-
KDE	+	+	-(+)	+-	-	+	-	-	-	-	+++	-
TD	+	-	-	-	-	+-	-	-	+	-	-	-
Lu der TD	-	+++	++	-	-	+-	-	-	-	-	+	-
TA	+	++	+	++	-	++	-	-	-	-	++	-
Rete	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	-
atr. Follikel	+-	+++	++ (kl)	-	-	- (kl+)	-	-	-	-	++	-
Lumen	-	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Makrophagen	+++	+++	++								++	

Tabelle 7: Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

atr. = atretisch, BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BGWZ = Bindegewebszellen, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GL = Granulosaluteinzellen, Gr = Granula, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, kl = klein, Lu = Lumen, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZP = Zona pellucida

1.2.1. Concanavalin A (Con A)

Im Ovar der Katze liegen zahlreiche Bindungsstellen für Con A vor. Bereits am Keimdrüsenepithel erkennt man eine schwache bis deutliche Fluoreszenz. Auch die darunterliegende Tunica albuginea reagiert positiv. Das Bindegewebe zeigt je nach Lokalisation unterschiedliche Reaktionen. An den Bindegewebszellen gibt es einige Bindungsstellen für Con A, die Bindegewebsfasern reagieren negativ oder nur schwach. Die Primordialfollikel zeigen in ihrem Ooplasma eine starke granuläre Reaktion mit Con A. Diese reduziert sich mit zunehmender Follikelgröße deutlich. Die Stärke der Fluoreszenz bei den Granulosazellen hingegen nimmt mit zunehmender Follikelgröße zu. Auch die Thekazellen in den Thekadrüsen oder in der Theca interna zeigen in ihrem Zytoplasma eine deutliche Reaktion. Das Epithel des Rete ovarii sowie das Zytoplasma der Granulosa- und Thekaluteinzellen reagiert stark positiv. Die Zona pellucida zeigt in den meisten Fällen keine oder nur schwache Reaktionen.

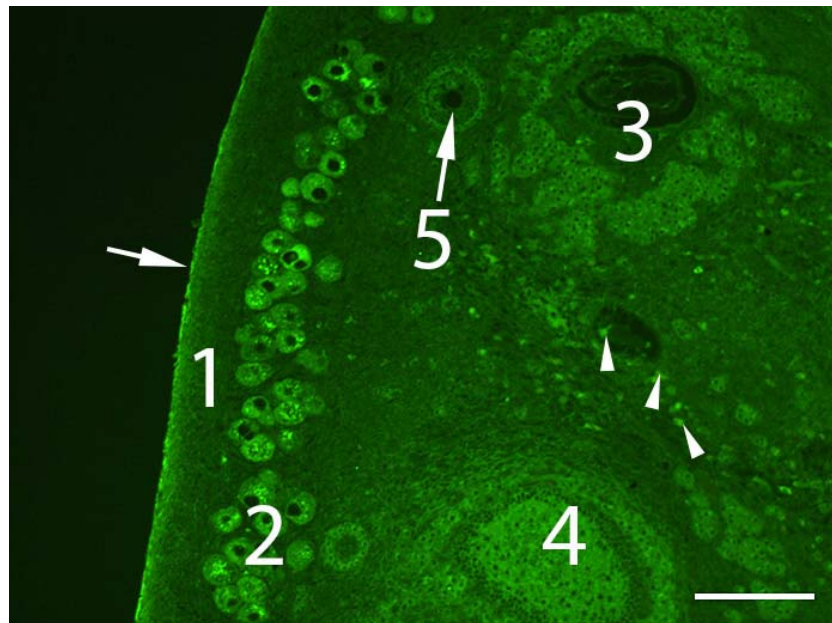


Bild 41: Ovar Katze, Ovarrinde, Con A

In der Ovarrinde befinden sich zahlreiche Primordialfollikel (2), deren Ooplasma positive granuläre Fluoreszenz zeigt. Auch das Keimdrüsenepithel (Pfeil) reagiert stark positiv mit Con A. Das Ooplasma der Primärfollikel (5) reagiert deutlich weniger, die Granulosazellen zeigen jedoch eine deutliche Fluoreszenz. Um das verbleibende Lumen (3) bildet sich eine Thekadrüse.

1 = Tunica albuginea, 4 = atretischer Follikel, Pfeilspitzen = eingewanderte Makrophagen
SB = 100µm

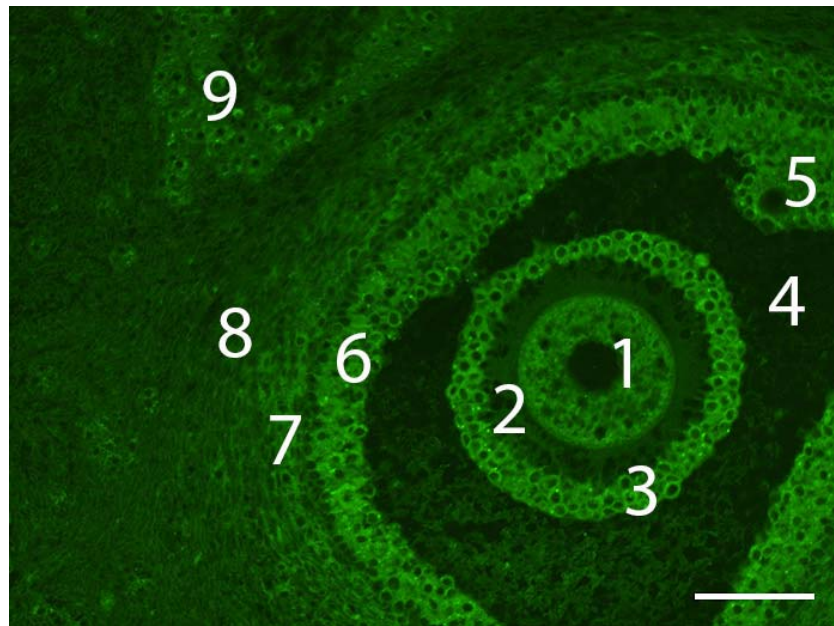


Bild 42: Ovar Katze, polyoozytärer Tertiärfollikel, Con A

Das Ooplasma (1) des Tertiärfollikels zeigt eine schwache Fluoreszenz. Die Zona pellucida (2) ist negativ. Die Granulosazellschicht (6) und die Corona radiata (3) sind deutlich positiv. In diesem polyoozytären Follikel ist eine deutlich kleinere zweite Eizelle (5) enthalten. Auch die Zellen der Thekadrüsen (9) zeigen eine deutliche Reaktion mit Con A.

4 = Antrum folliculi, 7 = Theca interna, 8 = Theca externa

SB = 50µm

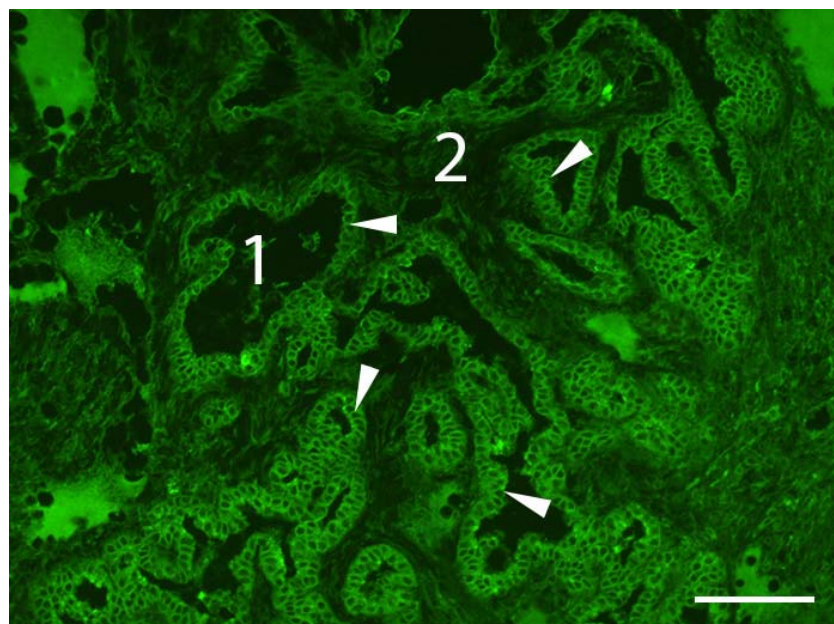


Bild 43: Ovar Katze, Rete, Con A

Das einschichtige isoprismatische Epithel (Pfeilspitzen) des intraovariellen Rete zeigt eine deutlich positive Reaktion nach Inkubation mit FITC-markiertem Con A.

1 = Lumen des Rete ovarii, 2 = stromales Bindegewebe

SB = 100µm

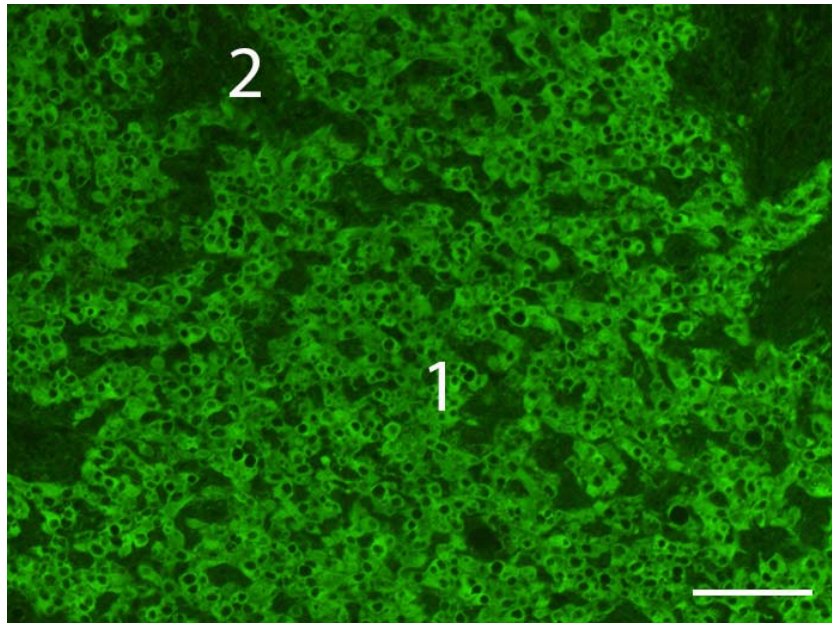


Bild 44: Ovar Katze, Gelbkörper, Con A

Die Luteinzellen (1) reagieren deutlich positiv bei Inkubation mit dem FITC-markierten Con A. Das dazwischenliegende Bindegewebe (2) zeigt keine Reaktion.
SB = 100µm

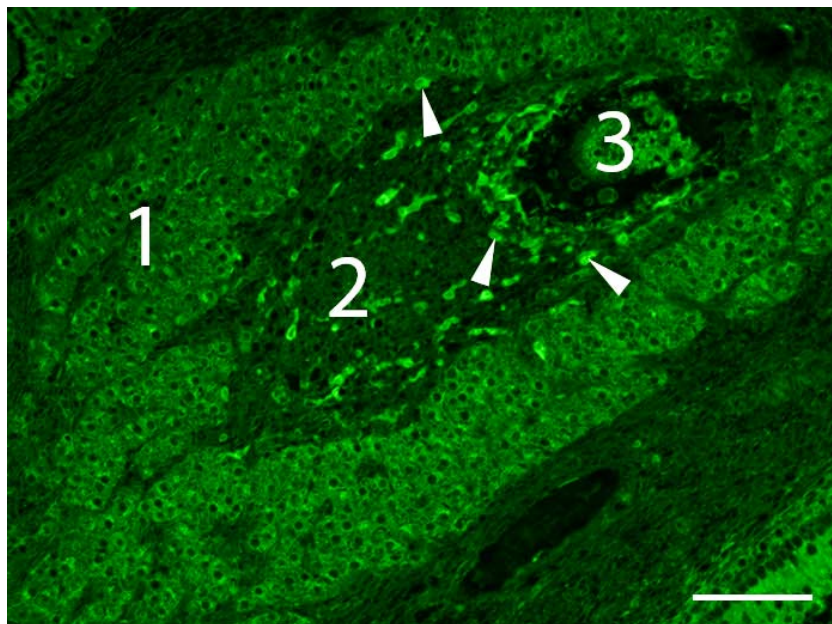


Bild 45: Ovar Katze, Thekadrüse, Con A

Im Lumen (3) der Thekadrüse befinden sich fluoreszierende Zellen und fluoreszierendes Material. Zwischen den negativen Bindegewebszellen (2) liegen einige Zellen (Pfeilspitzen), die stark positiv reagieren.
1 = Thekazellen
SB = 50µm

1.2.2. Wheat germ Agglutinin (WGA)

Die Bindungsstellen für WGA sind im Ovar der Katze zahlreich vorhanden. Bereits in einigen der Primordialfollikel ist eine schwache granuläre Fluoreszenz in den Eizellen zu detektieren. Die Reaktion im Ooplasma nimmt mit zunehmender Follikelgröße ab, wohingegen die Fluoreszenz der Granulosazellen bei zunehmender Größe zunimmt. Die Tunica albuginea fluoresziert stark, das darüberliegende Keimdrüsenepithel nur schwach oder kaum. Die stärkste positive Reaktion für WGA ist an der Zona pellucida nachweisbar sowie in den Resten der atretischen Follikel und im Lumen der Thekadrüsen. Bereits in den Primärfollikeln kann man eine beginnende Zonabildung erkennen. Im Zytoplasma einiger Granulosazellen sind auch schwache bis deutliche Reaktionen mit WGA wahrnehmbar. Diese sind in der Corona radiata deutlich stärker ausgeprägt.

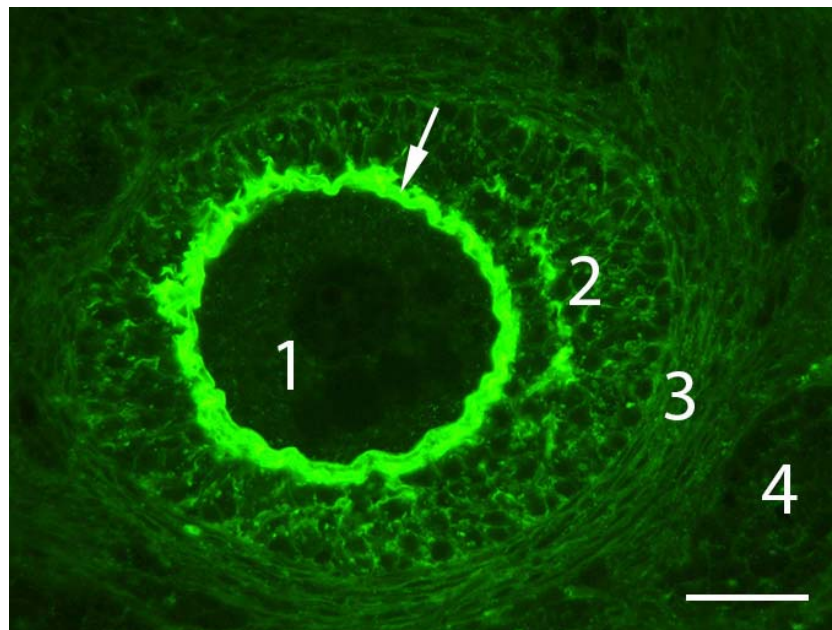


Bild 46: Ovar Katze, Sekundärfollikel, WGA

Im Ooplasma (1) des Sekundärfollikels ist keine Fluoreszenz zu detektieren, im Gegensatz zu den Granulosazellen (2), bei denen im Zytoplasma deutliche granuläre Reaktionen nachweisbar sind. Die Zona pellucida (Pfeil) reagiert sehr stark positiv. 3 = beginnende Thekaschichten, 4 = Thekazellen
Das Ooplasma ist vakuolisiert und die Zona pellucida ist in Falten gelegt. Diese Morphologie weist darauf hin, dass der Follikel bereits der Atresie verfallen ist.
SB = 40µm

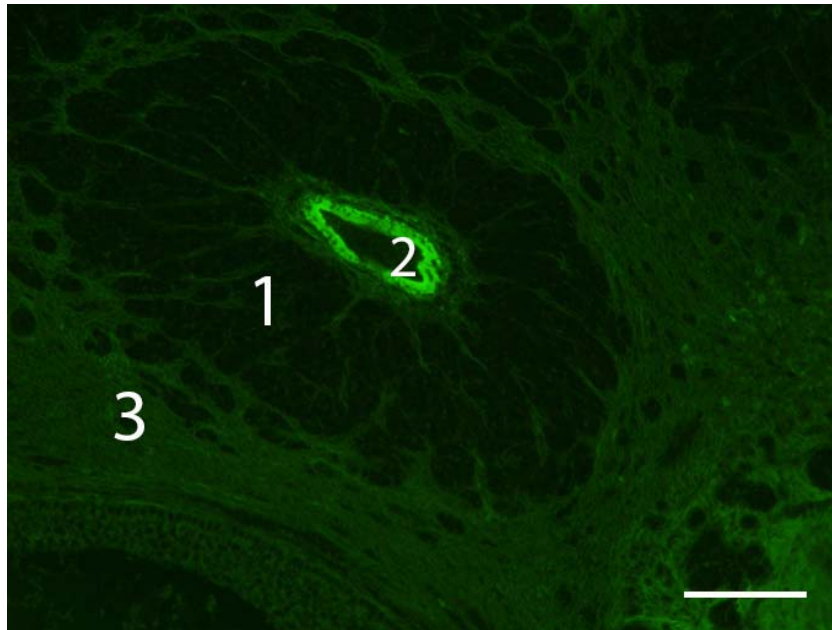


Bild 47: Ovar Katze, Thekadrüse, WGA

Das Lumen der Thekadrüse (2) zeigt eine sehr starke Fluoreszenz, wohingegen die Thekazellen (1) keine Reaktion zeigen.

3 = Bindegewebe

SB = 40 μ m

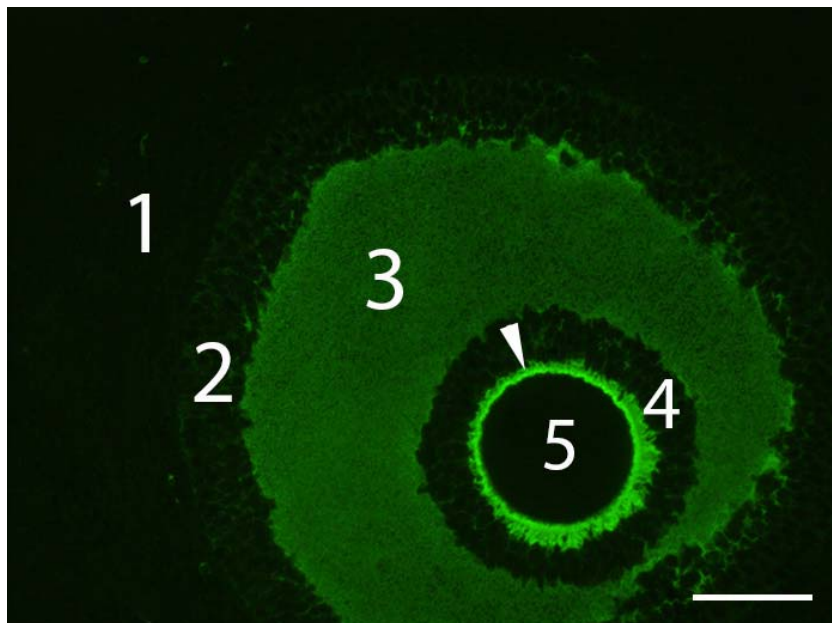


Bild 48: Ovar Katze, Tertiärfollikel, WGA

In dem Tertiärfollikel reagiert nur die Zona pellucida (Pfeilspitze) stark positiv. In der Follikelhöhle (3) ist auch eine deutliche Fluoreszenz zu detektieren.

1 = Thekaschichten, 2 = Granulosazellen, 3 = Follikelhöhle, 4 = Corona radiata,

5 = Eizelle

SB = 100 μ m

1.2.3. Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs)

Das succinylierte WGA (WGAs) reagiert im Ovar der Katze insgesamt etwas schwächer als das Lektin WGA. Die Zona pellucida zeigt meist eine starke Fluoreszenz und ist bereits ab dem Stadium des Primärfollikels zu erkennen. Die Granulosazellen reagieren häufig nur schwach oder nicht. Lediglich in der Corona radiata ist in einigen Schnitten eine stärkere Fluoreszenz zu detektieren. In der Tunica albuginea sind ebenso Bindungsstellen für WGAs vorhanden, wie auch in einigen Bereichen des Keimdrüsenepithels. Die Reste der atretischen Follikel reagieren stark positiv und in vereinzelt Follikeln ist im Ooplasma eine schwache granuläre Fluoreszenz nachzuweisen. Bei einigen Tertiärfollikeln ist im Antrum folliculi eine stark positive Reaktion zu erkennen.

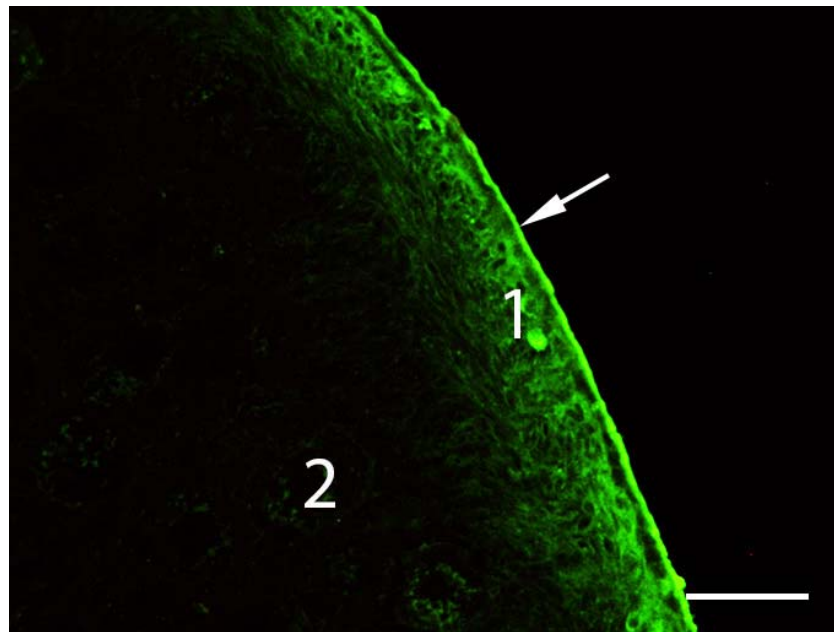


Bild 49: Ovar Katze, Ovarrinde, WGAs

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) zeigt sehr stark positive Reaktionen mit dem FITC-markierten WGAs. Die darunterliegende Tunica albuginea (1) zeigt eine starke Fluoreszenz.

Die Primordialfollikel (2) fluoreszieren granulär in ihrem Ooplasma.

SB = 40µm

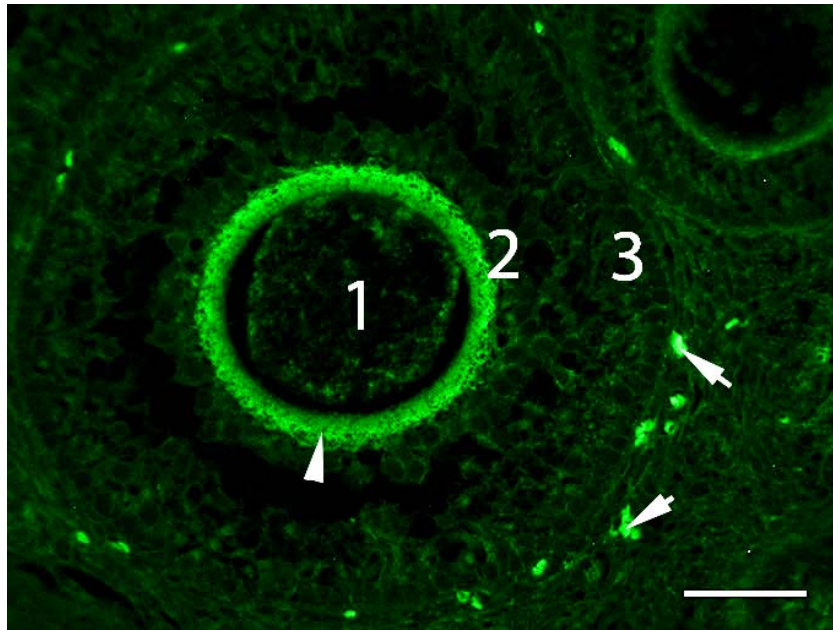


Bild 50: Ovar Katze, Sekundärfollikel, WGAs

In dem Sekundärfollikel reagiert vor allem die Zona pellucida (Pfeilspitze). Im Ooplasma (1) ist kaum Fluoreszenz zu erkennen. Auch die Granulosazellen (3) und die beginnende Corona radiata (2) zeigen in diesem Follikel keine nennenswerte Fluoreszenz.

Pfeile = stark positive Reaktionen einzelner Zellen in der Thekaschicht

SB = 40µm

1.2.4. *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Die Behandlung mit FITC-markiertem PSA ergibt eine deutliche granuläre Fluoreszenz im Ooplasma der Eizellen verschiedener Follikelstadien. Das Zytoplasma der Granulosazellen zeigt nur im perinukleären Bereich eine deutliche Fluoreszenz und zwar ab dem Stadium des Primärfollikels. Diese Lokalisation kann dem Golgi-Feld der Granulosazellen zugeordnet werden. Die Zona pellucida der Follikel weist auch Bindungsstellen für PSA auf. Im Bindegewebe sind je nach Lokalisation Reaktionen unterschiedlicher Stärke zu finden. In den meisten Bereichen ist eine schwache bis deutliche Fluoreszenz zu erkennen. Die Tunica albuginea zeigt durch ihre meist starke Reaktion das Vorhandensein vieler PSA-Bindungsstellen. Im Lumen der Gefäße ist eine sehr starke Fluoreszenz zu erkennen. Die Thekaluteinzellen des Gelbkörpers weisen erheblich mehr Bindungsstellen für PSA auf, als die Granulosaluteinzellen.

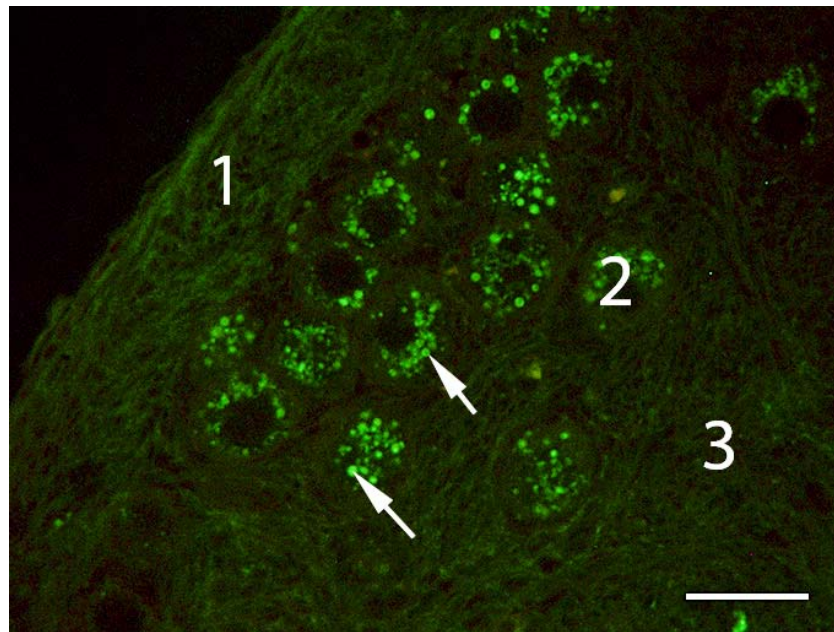


Bild 51: Ovar Katze, Primordialfollikel, PSA

Im Ooplasma der Primordialfollikel (2) ist deutliche granuläre Fluoreszenz (Pfeile) zu erkennen.

1 = Tunica albuginea, 3 = Bindegewebe

SB = 40µm

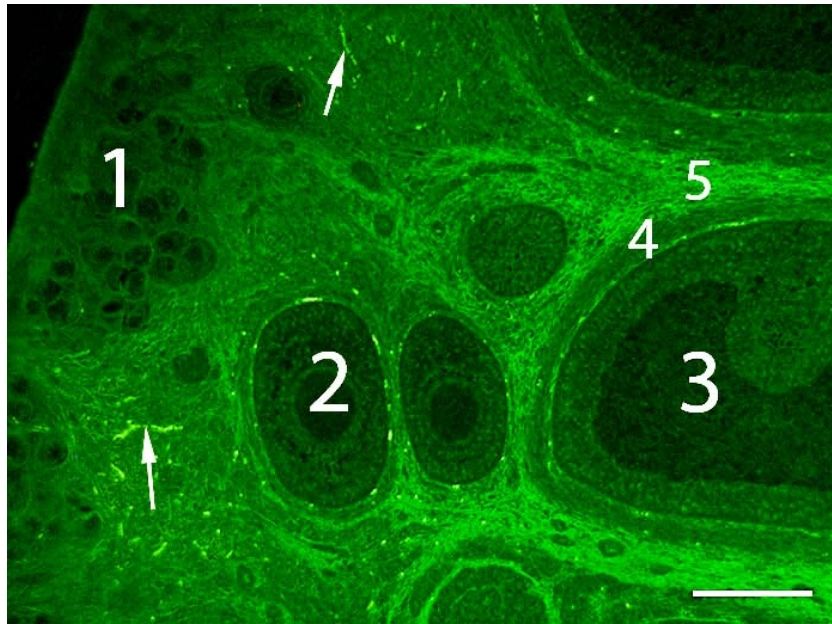


Bild 52: Ovar Katze, Ovarrinde, PSA

Vor allem das Bindegewebe (5) reagiert deutlich positiv mit PSA-FITC. Dazwischen sind auch stark positive Blutgefäße (Pfeile), bzw. die darin enthaltenen Erythrozyten zu erkennen.

1 = Primordialfollikel, 2 = Sekundärfollikel, 3 = Tertiärfollikel, 4 = Thekaschichten
SB = 100µm

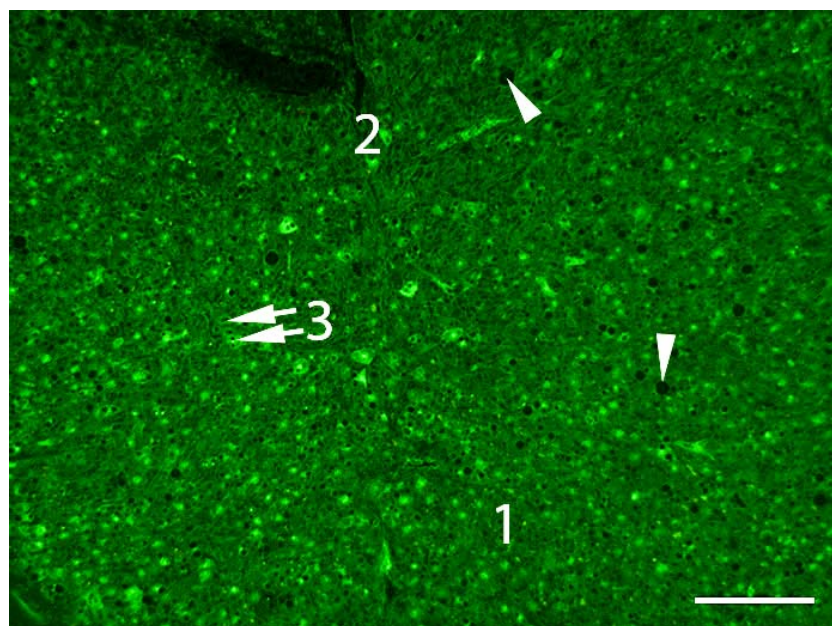


Bild 53: Ovar Katze, Gelbkörper, PSA

Die Granulosaluteinzellen (1) zeigen kaum Reaktionen, wohingegen einige Thekaluteinzellen (3) in ihrem Zytoplasma deutlich fluoreszieren.

2 = Bindegewebe, Pfeilspitzen = Fetttröpfchen

SB = 100µm

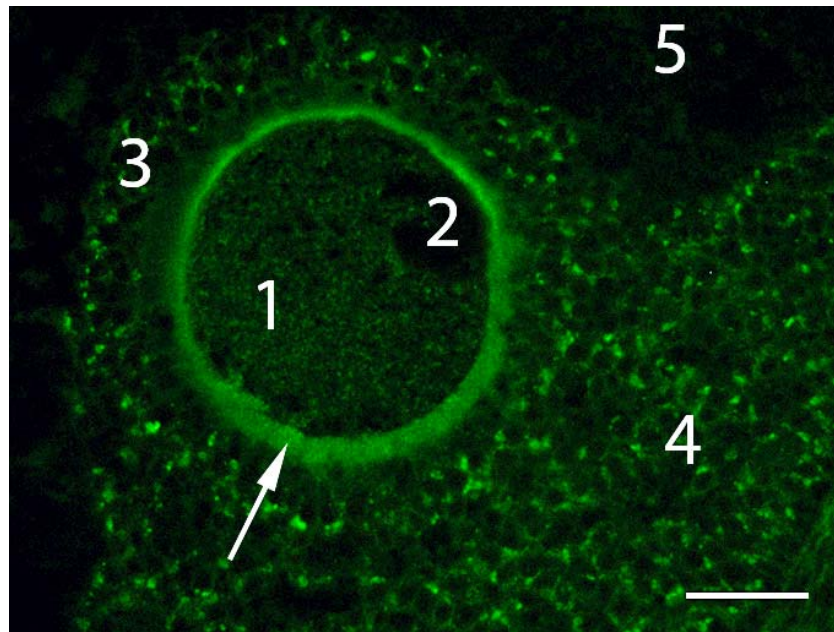


Bild 54: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PSA

Im Ooplasma (1) der Eizelle ist keine nennenswerte Reaktion zu detektieren. Die Zona pellucida (Pfeil) fluoresziert deutlich. Im Zytoplasma der Granulosazellen (4) ist perinukleär im Bereich des Golgi-Feldes eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen.

2 = Nukleus, 3 = Corona radiata, 5 = Follikelhöhle

SB = 40µm

1.2.5. *Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin (PHAE)

Die Bindungsstellen für PHAE befinden sich im Ovar der Katze vorwiegend in der Tunica albuginea und dem darüberliegenden Keimdrüsenepithel. Dort sind meist deutliche bis starke Reaktionen wahrnehmbar, die sich jedoch an Intensität je nach Lokalisation und Probe unterscheiden. In den Thekazellen in der Theca interna und in den Thekadrüsen ist eine schwache bis deutliche Fluoreszenz zu erkennen. Im Tertiärfollikel färbt sich vor allem die Zona pellucida deutlich an. Daneben weist auch die Theca interna mit den enthaltenen Thekazellen vermehrt PHAE-Bindungsstellen auf. Auch in den atretischen Follikeln, die Reste der Zona pellucida beinhalten, fluoresziert diese deutlich. Schwache Reaktionen sind in vielen Strukturen im feline Ovar zu detektieren.

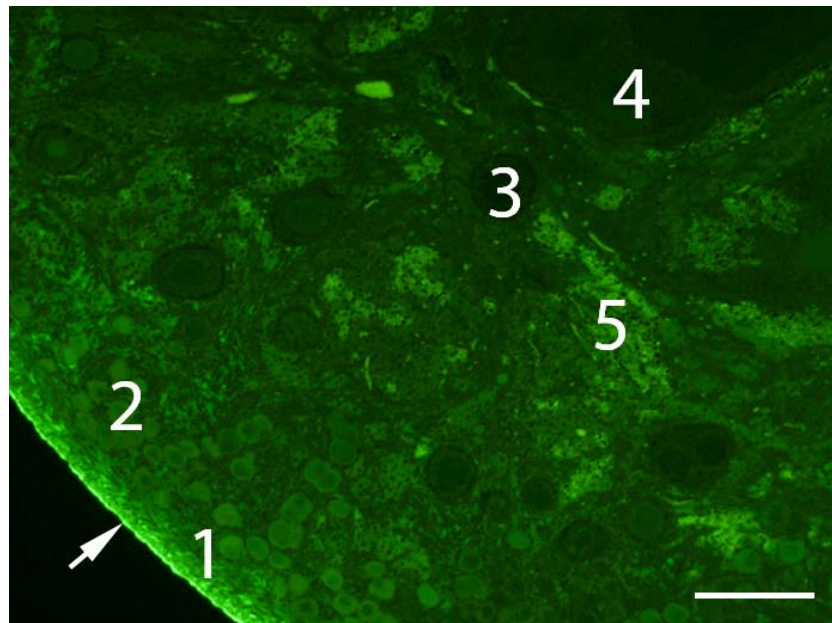


Bild 55: Ovar Katze, Ovarrinde, PHAE

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) zeigt eine starke Fluoreszenz. Die darunterliegende Tunica albuginea (1) fluoresziert deutlich.

2 = Primordialfollikel, 3 = Sekundärfollikel, 4 = Follikelhöhle eines Tertiärfollikels,

5 = Thekazellen

SB = 100µm

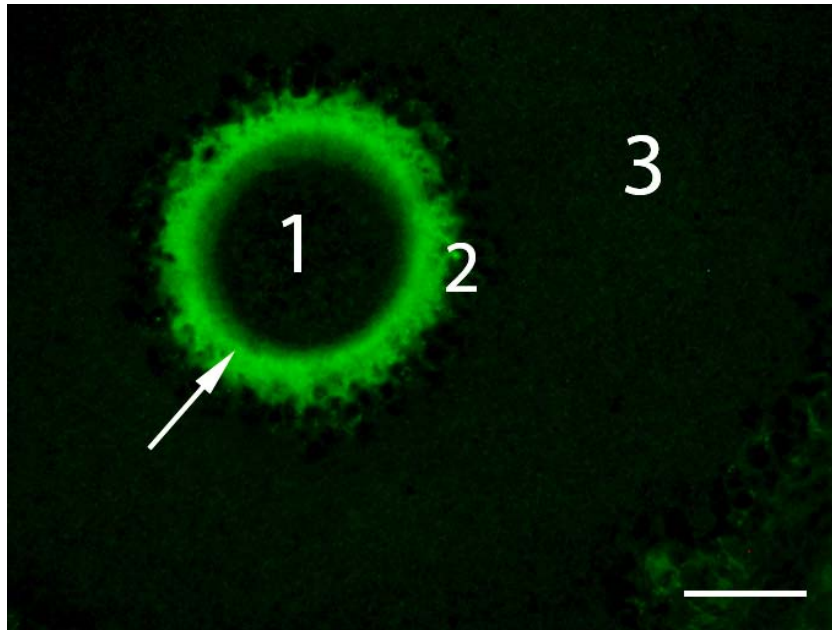


Bild 56: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PHAE

Bei diesem Tertiärfollikel zeigt die Zona pellucida (Pfeil) eine starke Fluoreszenz.
1 = Eizelle, 2 = Corona radiata, 3 = Follikelhöhle
SB = 40µm

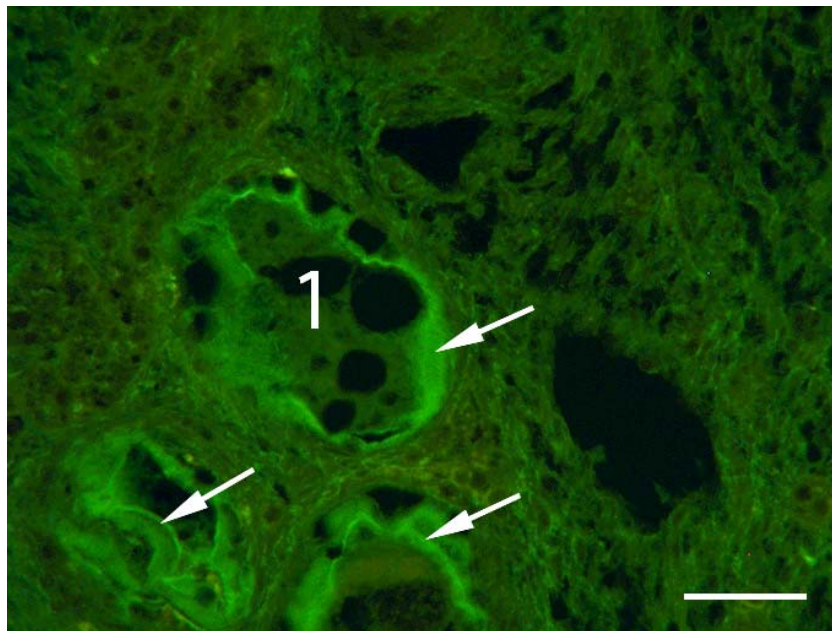


Bild 57: Ovar Katze, atretische Follikel, PHAE

Bei den Überresten der atretischen Follikel (1) reagieren nur die Reste der Zona pellucida (Pfeile) deutlich.
SB = 40µm

1.2.6. Viscum album Agglutinin (VAA)

Das Lektin VAA zeigt deutliche Reaktionen bei den Thekazellen in der Theca interna von Tertiärfollikeln oder in Thekadrüsen. Im Gelbkörper ist auch bei den Granulosaluteinzellen eine deutliche Bindung von VAA zu detektieren. Die Granulosazellen reagieren lediglich in den Tertiärfollikeln schwach. Das restliche Gewebe zeigt keine Reaktion bei Behandlung mit VAA.

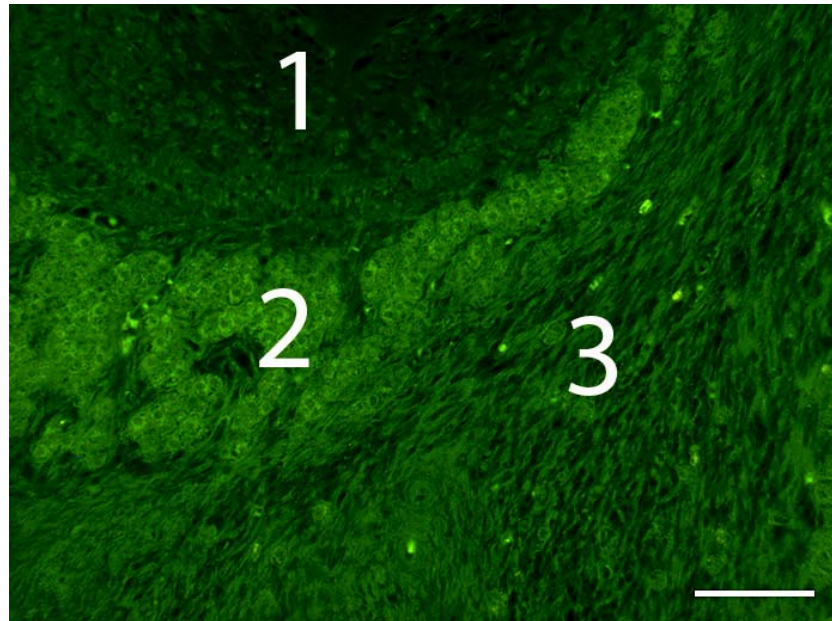


Bild 58: Ovar Katze, Wand eines degenerierenden Follikels, VAA

In das ehemalige Lumen (1) des degenerierenden Follikels sind Zellen eingewandert. Die Thekazellen (2) der Theca interna hypertrophieren und zeigen in ihrem Zytoplasma eine schwache bis deutliche Reaktion mit VAA.

3 = Bindegewebe mit Gefäßen (vereinzelt im Lumen starke Reaktionen)

SB = 50µm

1.2.7. *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

Die glykohistochemischen Untersuchungen der felines Ovarien zeigen eine Bindung von SNA in vielen Strukturen des Ovars. Bereits in den Primordialfollikeln sind im Ooplasma vereinzelt schwache, granuläre Reaktionen zu detektieren. Die Primärfollikel zeigen in ihrem Zytoplasma in einigen Bereichen granuläre Fluoreszenz. In den Sekundär- und Tertiärfollikeln weist die innere Schicht der Zona pellucida deutlich mehr Bindungsstellen für SNA auf als die äußere. In den Tertiärfollikeln reagieren einzelne Zellen der Corona radiata oder Granulosazellschicht in ihrem Zytoplasma stark positiv neben anderen, deren Zytoplasma keine Reaktion zeigt. Im Gelbkörper wird vor allem in den Granulosaluteinzellen eine starke zytoplasmatische, granuläre Fluoreszenz beobachtet. Die Tunica albuginea reagiert meist stark positiv, das darüberliegende Keimdrüsenepithel in einigen Bereichen sogar sehr stark positiv.

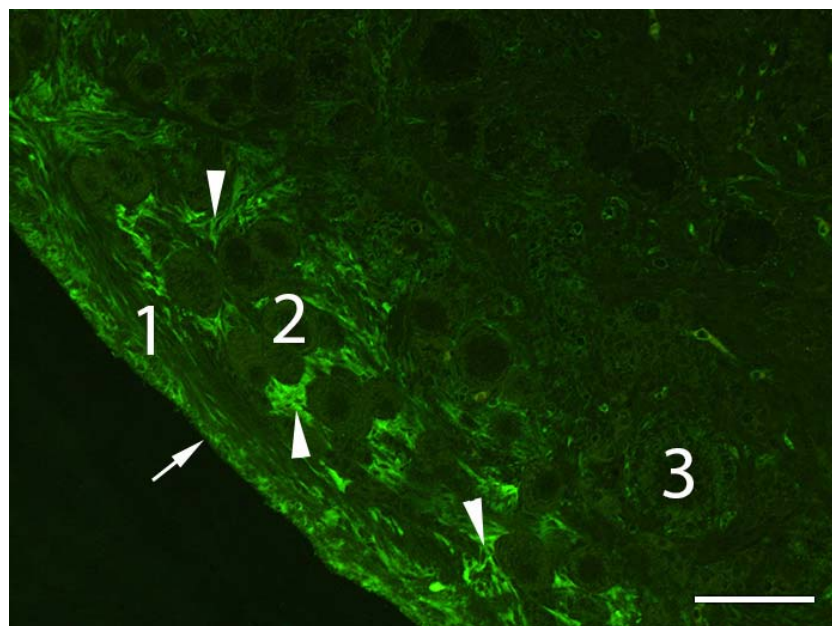


Bild 59: Ovar Katze, Ovarrinde, SNA

Unter dem Keimdrüsenepithel (Pfeil) befindet sich die Tunica albuginea (1). Die Primordialfollikel (2) zeigen keine Reaktion mit SNA. Das dazwischenliegende Bindegewebe (Pfeilspitzen) fluoresziert stark positiv.

3 = Primärfollikel

SB = 50µm

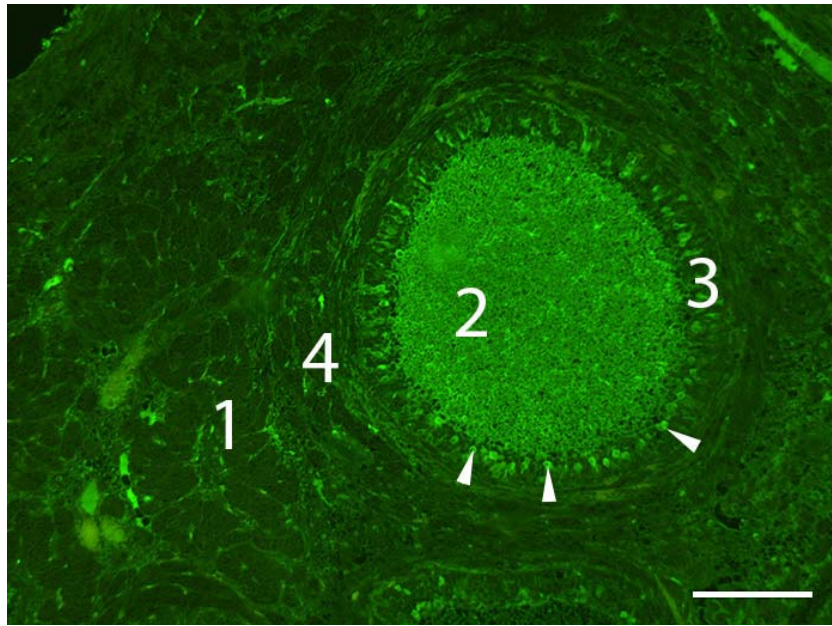


Bild 60: Ovar Katze, Übersicht, SNA

Die Thekazellen (1) der Thekadrüsen zeigen keine Reaktion, das dazwischenliegende Bindegewebe hingegen fluoresziert stark. Auch in der Follikelhöhle (2) ist eine starke Fluoreszenz zu erkennen. Die Granulosazellen (3) sind vorwiegend negativ, aber einzelne Zellen in den mittleren oder antralen Schichten (Pfeilspitzen) reagieren in ihrem Zytoplasma stark positiv mit SNA.

4 = Thekaschichten

SB = 100µm

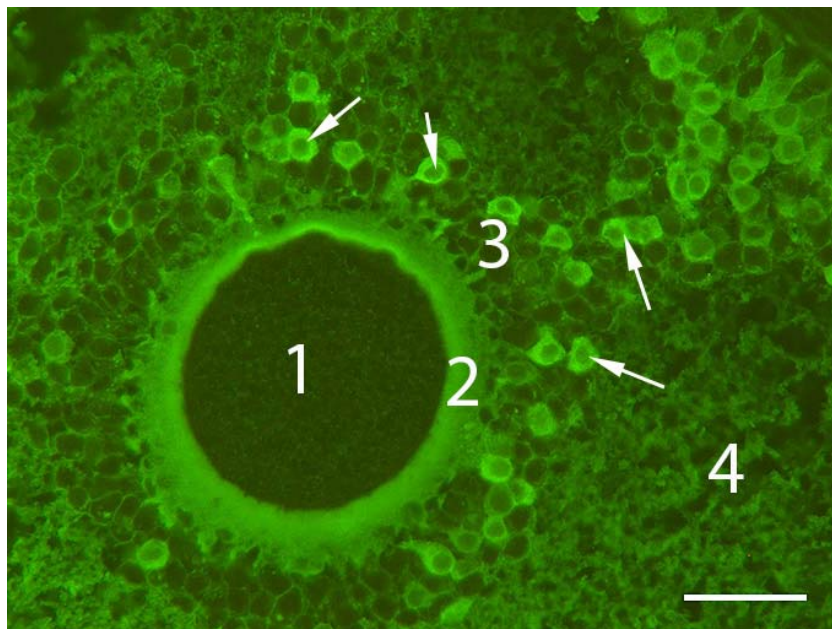


Bild 61: Ovar Katze, Tertiärfollikel, SNA

Die Zona pellucida (2) reagiert stark mit SNA. Die an die Zona pellucida angrenzenden Corona radiata Zellen (3) sind vorwiegend negativ, dazwischen reagieren aber auch einzelne Zellen (Pfeile) stark in ihrem Zytoplasma.

1 = Ooplasma, 4 = Follikelhöhle

SB = 40µm

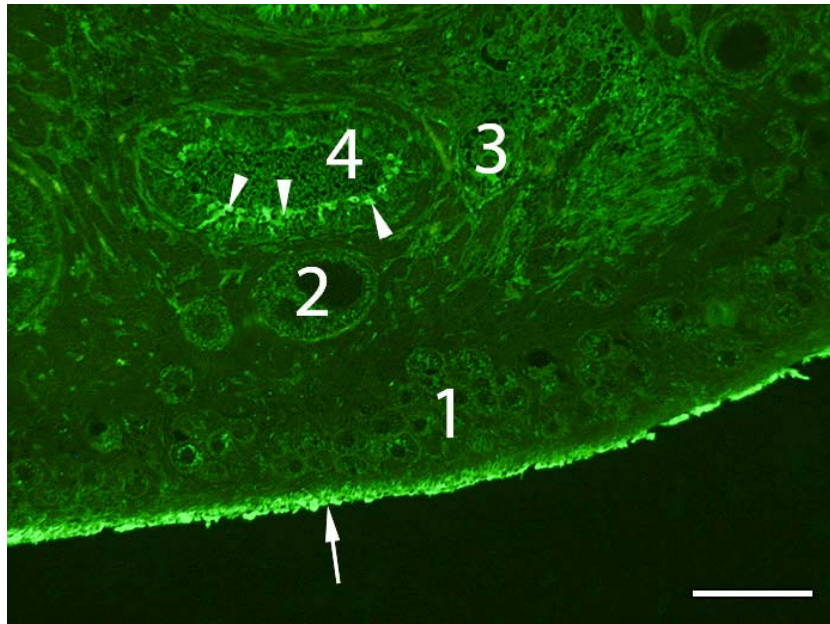


Bild 62: Ovar Katze, Ovarrinde, SNA

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) reagiert stark positiv, auch die direkt darunterliegende Schicht der Tunica albuginea fluoresziert. Im Ooplasm einiger Primordialfollikel (1) ist eine granuläre Fluoreszenz zu detektieren. Im perinukleären Bereich der Granulosazellen des Tertiärfollikels (2) ist eine leicht positive Reaktion zu erkennen. In dem größeren Tertiärfollikel (4) sind bei einigen vorwiegend antralen Granulosazellen (Pfeilspitzen) starke zytoplasmatische Reaktionen erkennbar.

3 = atretischer Follikel

SB = 100µm

1.2.8. GSA I, MAA I, RCA, SJA, PHA L

Die Lektine Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSA I), Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I), Sophora japonica Agglutinin (SJA) und Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA L) zeigten keine positive Reaktion im Ovargewebe der Katze.

Lediglich bei Ricinus communis Agglutinin (RCA) waren in den Granulosazellen der Sekundär- und Tertiärfollikel schwache Reaktionen nachzuweisen.

1.3. Immunhistochemische Untersuchungen

1.3.1. Pancytokeratin

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	- (wenige ++)	-	-	-	-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	- (wenige +++)	-	-	-	-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	-
Ti				-	
Te				-	
CR				-	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	-	-	-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	-	-	-	+++	+++

Tabelle 8: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Bei allen untersuchten Schnitten ist das Keimdrüsenepithel deutlich positiv, ebenso wie das Rete ovarii und Anschnitte des Eileiters, die auf einigen der untersuchten Schnitte vorhanden waren. Das restliche Ovargewebe mit den enthaltenen Funktionsgebilden ist negativ. Nur vereinzelte Primordialfollikel sind von stark positivem Follikelepithel umgeben. Bei diesen färben sich sowohl Granulosazellen, als auch Basalmembran dunkelbraun an. Die meisten jedoch sind negativ und zeigen keine immunhistochemische Reaktion.

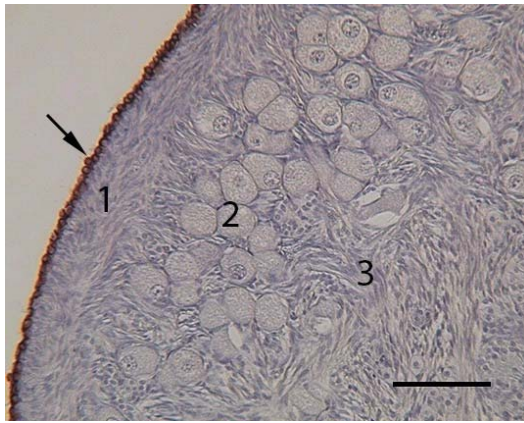


Bild 63: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Das isoprismatische Keimdrüsenepithel (Pfeil) reagiert stark positiv, wohingegen alle anderen Strukturen in der Ovarrinde negativ sind.

1 = Tunica albuginea, 2 = Primordialfollikel, 3 = Fibrozyten

SB= 100µm

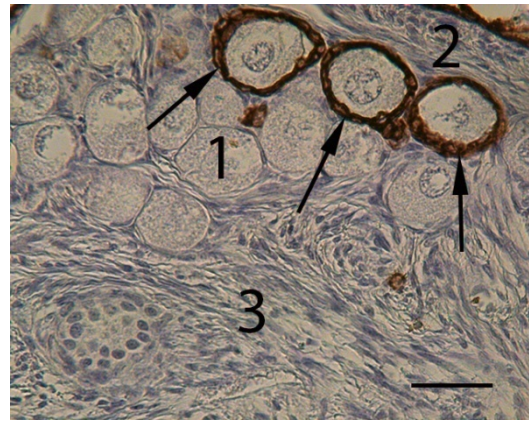


Bild 64: Ovar Katze, Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Vereinzelte Primordialfollikel in der Ovarrinde zeigen ein deutlich positives Follikelepithel (Pfeile) neben einer großen Anzahl Primordialfollikel (1), die keine Reaktionen der Granulosazellen aufweisen. 2 = Tunica albuginea, 3 = Fibrozyten

SB= 40µm

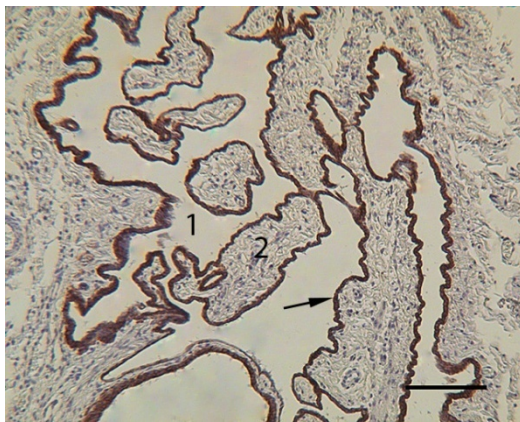


Bild 65: Ovar Katze, intraovarielles Rete, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Das in dem abgebildeten Bereich isoprismatische, einschichtige Epithel (Pfeil) des Rete ovarii zeigt eine starke Reaktion.

1 = Lumen, 2 = Bindegewebe

SB = 100 µm



Bild 66: Ovar Katze, atretischer Primär-/Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Um einen der Atresie verfallenen Follikel (3) reagiert das verbleibende Follikelepithel (Pfeil) deutlich positiv. (Das Keimdrüsenepithel ist in diesem Bereich fixationsbedingt nicht vollständig erhalten.) 1 = Primordialfollikel, 2 = Tunica albuginea

SB = 40µm

1.3.2. Vimentin

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	+/-	-	-	-	-
Oo	+/-	-	-	-	-
GZ	+	++	+	+(v.a. basal)	+/-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	
Ti				+	
Te				++	
CR				++ (v.a. Zyto- plasmaausläufer	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	++	- (Endothel +)	+/-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	++	+++	++ (Zytoplasma)	+/-	-

Tabelle 9: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Der immunhistochemische Nachweis von Vimentin ergibt in zahlreichen Strukturen des Ovars eine positive Reaktion. Besonders stark reagieren die Granulosazellen der verschiedenen Follikelstadien, wobei sich die Granulosazellen je nach Lage und Position im Follikel unterschiedlich verhalten. Die an der Follikelwand basal sowie die zur Follikelhöhle luminal gelegenen Granulosazellen färben sich deutlich an, ebenso wie die, die Eizelle direkt umschließenden, und mit ihr in Kontakt stehenden Granulosazellen, welche die innerste Schicht der Corona radiata bilden. Die Zytoplasmaausläufer, die von den Follikelzellen in Richtung Zona pellucida bzw. Eizelle entlassen werden, sind durch eine intensive Anfärbung deutlich zu erkennen. Die Reaktion der Granulosazellen mit dem Vimentin-Antikörper nimmt jedoch mit zunehmender Follikelgröße ab, ebenso wie bei atretischen Follikeln. Die großen Luteinzellen der Gelbkörper sowie die Thekaluteinzellen der Theca folliculi interna und der Thekadrüsen zeigen ein stark positives Zytoplasma. Auch das Bindegewebe reagiert an einigen Stellen deutlich positiv, vor allem die Tunica albuginea und die Theca externa der Tertiärfollikel. Die in atretische Follikel in die Follikelwand und ehemalige Follikelhöhle einwandernden Zellen zeigen ebenso einen positiven Vimentinnachweis.

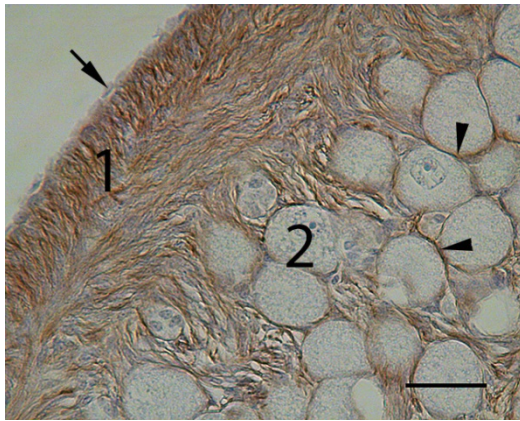


Bild 67: Ovar Katze, Rinde, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) zeigt keine Reaktion mit Vimentin. Die darunterliegende Tunica albuginea (1) reagiert deutlich positiv. Um die Primordialfollikel (2) herum färbt sich eine dünne Basalmembran (Pfeilspitzen) an.

SB= 40µm

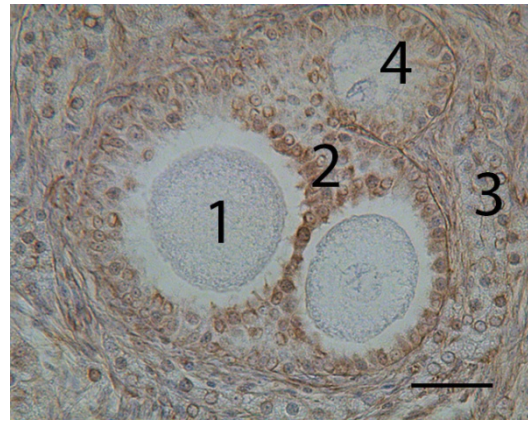


Bild 68: Ovar Katze, polyoozytärer Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Der polyoozytäre Sekundärfollikel enthält zwei Eizellen (1). Die umliegenden Granulosazellen (2) zeigen eine deutliche Reaktion, vor allem die zwischen beiden Eizellen gelegenen.

3 = Thekazellen, 4 = Primärfollikel

SB= 40µm

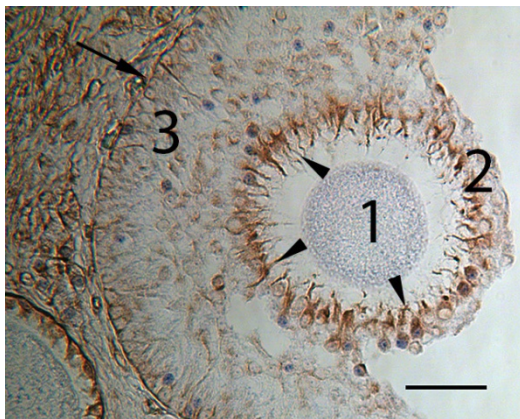


Bild 69: Ovar Katze, Tertiärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Die Oozyte (1) ist von den Corona radiata Zellen (2) umschlossen. Diese entlassen Zytoplasmafortsätze (Pfeilspitzen) in Richtung der Eizelle, die das stärkste Anfärbeverhalten zeigen. Die Granulosazellen (3) färben sich vor allem basal am deutlichsten an. Pfeil = Basalmembran

SB = 40 µm

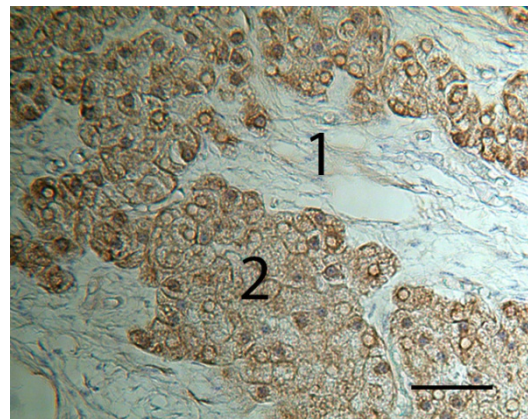


Bild 70: Ovar Katze, Thekadrüse, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Das zentral gelegene Bindegewebe (1) zeigt keine Reaktion mit dem Vimentin-Antikörper. Das Zytoplasma der Thekazellen (2) zeigt eine deutliche Reaktion.

SB = 40µm

1.3.3. Laminin

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	+	+	+	++	+
Oo	-	-	-/+	+-	-
GZ	-	-	+-	+- (luminal)	-
ZK	-	- (Nukleolus+-)	- (Nukleolus+-)	- (Nukleolus+-)	
ZP			-	-	
Fh			-	-	
Ti				+-	
Te				+	
CR				+-	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	-	Endothel + T. muscularis ++	+	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	+- /++	+-	-	+-	- (BSM +)

Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, T. = Tunica, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Der immunhistochemische Nachweis von Laminin zeigt vorwiegend positive Reaktionen an der, den Follikel umgebenden, Basalmembran. Auch die zwischen dem Keimdrüsenepithel und der Tunica albuginea gelegene Basalmembran reagiert schwach positiv. An den Gefäßen sieht man am Endothel aller Gefäße eine Anfärbung, sowie eine stärkere Anfärbung an der Tunica muscularis von arteriellen Gefäßen. Das Bindegewebe reagiert unterschiedlich, je nach Lokalisation, so ist es beispielsweise im kortikalen Bereich um die Primordialfollikel intensiv braun angefärbt, wohingegen die im Lumen der Thekadrüsen befindlichen Bindegewebsfasern nicht reagieren. Vereinzelt auftretende Muskelfaserbündel zeigen auch einen positiven Nachweis.

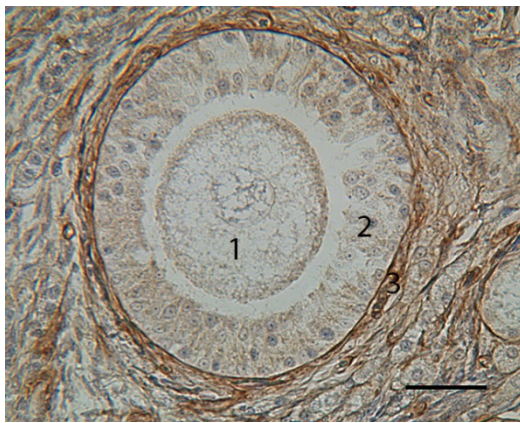


Bild 71: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Laminin

In dem Follikel selbst sieht man nur eine schwache Reaktion der Granulosazellen (2) und evtl. eine geringe Anfärbung des Oolems, welches die Eizelle (1) umgibt. Die den Follikel umschließende Basalmembran und der daran anschließende innere Anteil der sich bildenden Theca interna (3) färben sich deutlich braun.

SB= 40µm

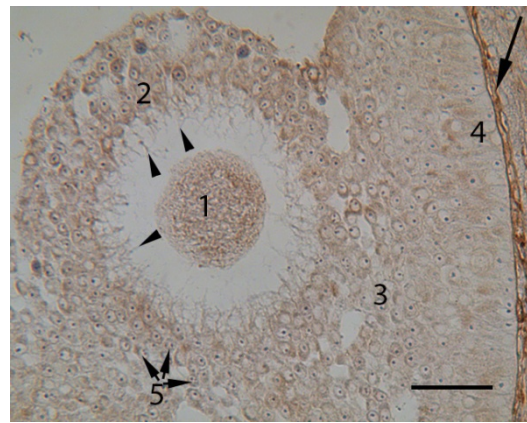


Bild 72: Ovar Katze, Tertiärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Das Ooplasma (1) des Tertiärfollikels färbt sich auch schwach braun an. Die Zona pellucida wird nicht angefärbt, allerdings die Zytoplasmfortsätze (Pfeilspitzen) der Corona radiata Zellen (2). Deren Zytoplasma färbt sich auch schwach an, wie das der gesamten Granulosazellen (4). Die Basalmembran (Pfeil) zeigt eine starke Reaktion.

3 = Cumulus oophorus, 5 = Mitosefiguren

SB = 40µm

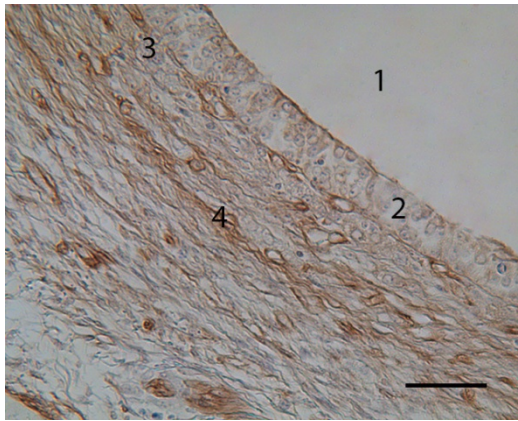


Bild 73: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Der lumenseitige Anteil der Granulosazellen (2) färbt sich deutlicher an als die mittleren Schichten.

Die Thekazellen (3) zeigen keine oder nur eine geringe Anfärbbarkeit. Das Bindegewebe (4) in der Theca externa hingegen reagiert deutlich positiv.

1 = Follikelhöhle

SB = 40 µm



Bild 74: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) ist negativ und die darunter liegende Tunica albuginea (3) färbt sich nur schwach an. Die Basalmembran (Pfeilspitzen) um die Primordialfollikel (2) färbt sich deutlich an. 1 = Bindegewebe

SB = 40µm

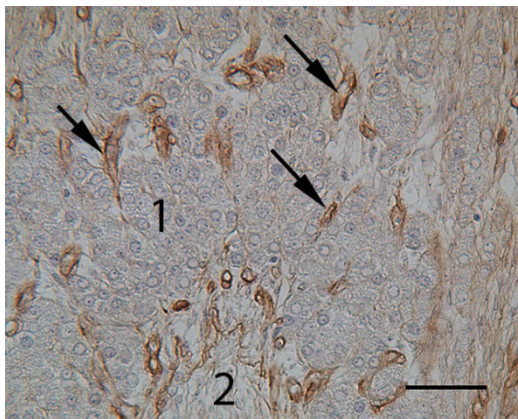


Bild 75: Ovar Katze, Thekadrüsen, immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Die Thekazellen (1) in den interstitiellen Drüsen zeigen keine Reaktion im Gegensatz zu dem dazwischen liegenden Bindegewebe mit enthaltenen Gefäßen (Pfeile). Das im Zentrum der Drüse liegende Bindegewebe (2) bleibt negativ.

SB= 40µm

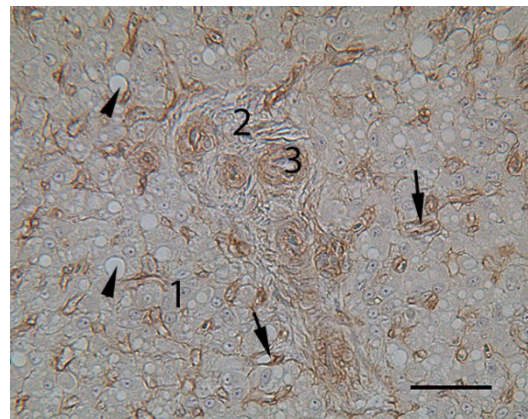


Bild 76: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Laminin

Die Granulosaluteinzellen (1) färben sich nicht, oder nur kaum an. Das zwischen den Luteinzellen liegende Bindegewebe enthält kleine Gefäße, deren Basalmembran (Pfeile) eine deutliche Reaktion zeigt. Das zentral gelegene Bindegewebe (2) ist negativ. Die darin liegenden Gefäße (3) reagieren in der Tunica media stark positiv. Pfeilspitzen = Fetttropfchen

SB = 40µm

1.3.4. Desmin

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	-	-	-	-	-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	-
Ti				-	
Te				-	
CR				-	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	-	T. muscularis +/-	-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	- glatte Muskelzellen +	-	-	+/-	-

Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, T. = Tunica, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Der immunhistochemische Nachweis von Desmin zeigt nur in sehr wenigen im Ovar der Katze vorkommenden Strukturen eine positive Reaktion. Alle im Ovar vorkommenden Funktionsgebilde sind negativ. Sogar die in der Ovarrinde vorkommenden Gefäße färben sich nicht an. Lediglich vereinzelt im Ovar vorkommende glatte Muskelfasern, sowie die im Markbereich, Mesovar und Hilusbereich vorkommenden Gefäße zeigen in der Tunica muscularis eine schwach positive Reaktion. Die im Ovarmark und Mesovar zu Bündeln zusammengelagerten Muskelzellen zeigen eine deutlich positive Reaktion. Ebenso reagieren in dem stromalen Gewebe unterhalb des Rete ovarii vereinzelt Zellen.

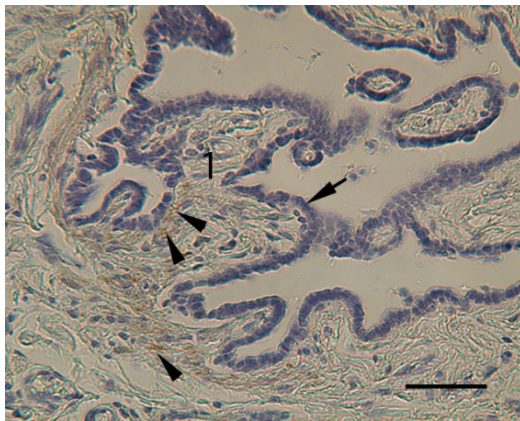


Bild 77: Ovar Katze, intraovarielles Rete, immunhistochemischer Nachweis von Desmin

Unterhalb des einschichtigen isoprismatischen Epithels (Pfeil), des Rete ovarii, reagieren einzelne im stromalen Bindegewebe (1) befindliche Zellen (Pfeilspitzen).

SB= 40µm

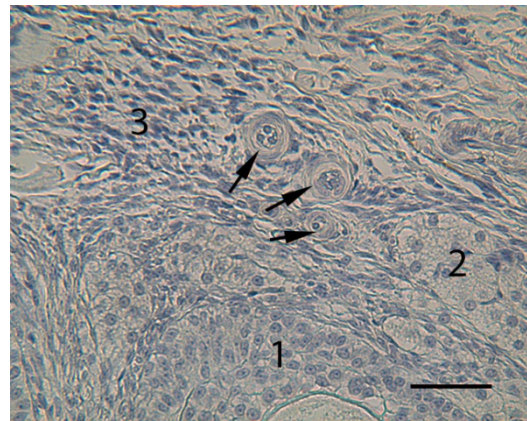
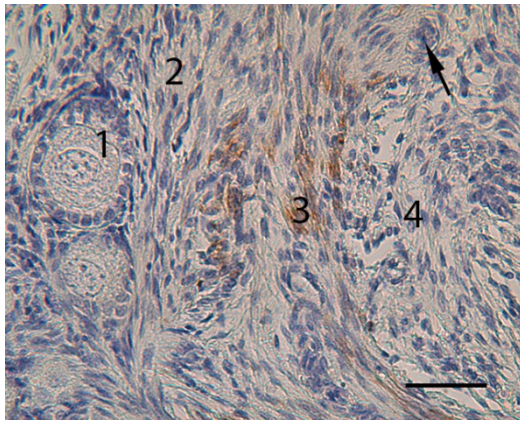


Bild 78: Ovar Katze, Gefäße, immunhistochemischer Nachweis von Desmin

Sämtliche im Ovar vorkommenden Strukturen reagieren negativ. Sogar die Tunica media der, im Ovar befindlichen Blutgefäße (Pfeile), zeigt keine Reaktion. 1 = Follikelepithel, 2 = Thekadrüsen, 3 = Bindegewebe

SB = 40µm



**Bild 79: Ovar Katze, Ovarmark,
immunhistochemischer Nachweis von
Desmin**

Die zwischen den Bindegewebszellen (2)
vorhandenen Muskelzellen (3) färben sich
deutlich positiv an.

1 = Primärfollikel, 4 = lockeres

Bindegewebe,

Pfeil = Blutgefäß

SB = 40 µm

1.3.5. Synemin

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	+	+	+	+	+
GZ	-	-	+/- (apikal)	-/+ (apikal)	-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	-
Ti				-	
Te				-	
CR				-/+ (apikal)	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	+/-	-	-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	+/-	+/-	-	-	++

Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von Synemin

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Die zwei beim immunhistochemischen Nachweis von Synemin deutlich reagierenden Strukturen sind das Keimdrüsenepithel und das Ooplasma der Eizellen. Die Epithelzellen des Oberflächenepithels zeigen sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma positive Reaktionen. Die Reaktion des Ooplasmas ist bei allen Follikelstadien nachweisbar, nimmt jedoch leicht ab in Korrelation zur Zunahme der Follikelgröße.

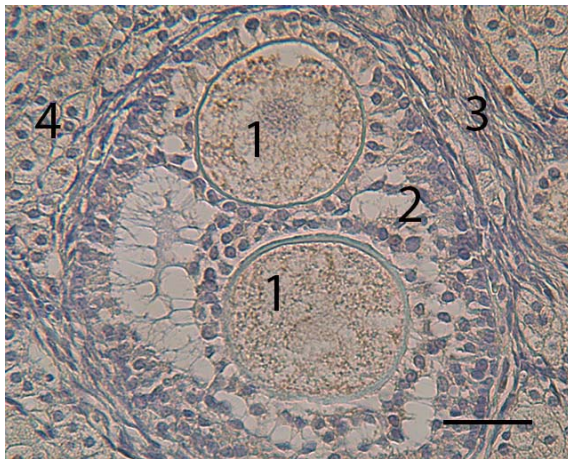


Bild 80: Ovar Katze, polyoozytärer Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Synemin

Das Ooplasma (1) der zwei, in dem Sekundärfollikel enthaltenen Eizellen, färbt sich deutlich an. Die Granulosazellen (2) sowie die umliegenden Fibrozyten (3) und die Thekazellen (4) sind negativ.

SB= 40µm

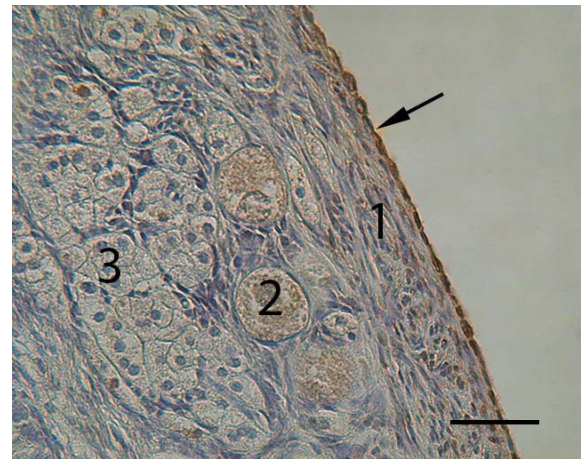


Bild 81: Ovar Katze, Rinde, immunhistochemischer Nachweis von Synemin

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) zeigt eine stark positive Reaktion. In der darunterliegenden Tunica albuginea (1) reagieren nur vereinzelte Zellen.

Auch das Ooplasma der Primordialfollikel (2) färbt sich an.

3 = Thekazellen

SB = 40µm



Bild 82: Ovar Katze, Tertiärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Synemin

Das Ooplasma (1) der Eizelle reagiert nur schwach, am ehesten direkt unter dem Oolemn.
Die Granulosa- (4) und Corona radiata Zellen (3) zeigen keine Reaktion.
2 = Zona pellucida

SB = 40 μ m

1.3.6. Tubulin

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	+	++ (CP)	++ (CP)	++ (CP)	++ (CP)
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	+/-
Ti				-	+
Te				+	+
CR				++ (CP)	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	+/-	+	+(T. media)	+/-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	+/-	-	+- (Lu++)	++ (CP) hoch>iso>flach	-

Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CP = Zytoplasma, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Lu = Lumen, Oo = Ooplasma, T. = Tunica, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Der immunhistochemische Nachweis von Tubulin ergibt deutlich positive Reaktionen im Zytoplasma der Granulosazellen von Follikeln verschiedener Stadien. Auch die Zytoplasmafortsätze sind durch ihre Reaktion mit Tubulin gut zu erkennen. Das Bindegewebe färbt sich in einigen Bereichen deutlich an, so z.B. in der Theca externa um den Follikel herum. Andere Regionen zeigen keine Reaktion des Bindegewebes. In den Gefäßen reagiert vor allem die Tunica media positiv. Die Thekazellen der Thekadrüsen zeigen eine schwache Reaktion im Zytoplasma, wohingegen das zentral gelegene Gewebe sich häufig intensiv anfärbt. Das zwischen den in konzentrisch angeordneten Strängen von Thekazellen gelegene Bindegewebe ist meist negativ. Beim Rete nimmt die Intensität der Reaktion mit der Höhe des Epithels zu, vom intraovariellen, über das konnektive, bis hin zum extraovariellen Rete. Im Corpus luteum reagieren primär die Granulosaluteinzellen und die Gefäße.

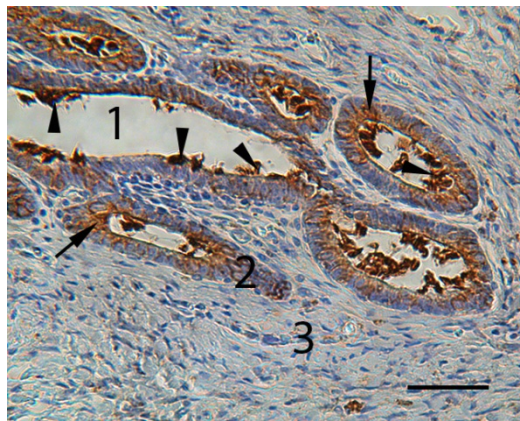


Bild 83: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Sowohl in den Epithelzellen des Rete (2), als auch im Lumen (1) sind positive Reaktionen zu verzeichnen.

Vor allem die luminale Seite der Epithelzellen (Pfeil) und auch die im Lumen enthaltenen Sekretionsprodukte oder Zellen (Pfeilspitzen) zeigen eine starke Reaktion mit dem Tubulin-Antikörper.

3 = stromales Bindegewebe

SB= 40µm

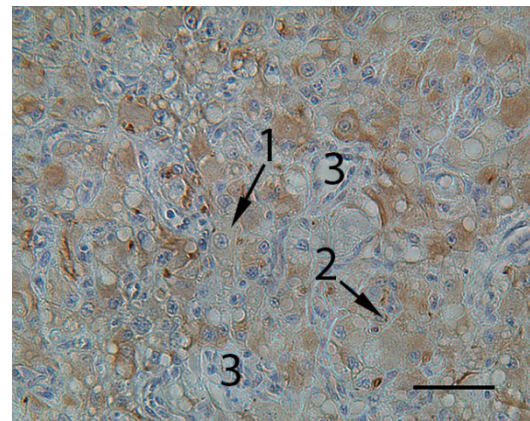


Bild 84: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Die großen Luteinzellen oder Granulosaluteinzellen (1) zeigen im Zytoplasma Reaktionen unterschiedlicher Stärke. Das Zytoplasma der kleinen Luteinzellen oder Thekaluteinzellen (2) färbt sich auch schwach an. Die dazwischen liegenden Bindegewebszellen (3) und Gefäße zeigen hier keine Reaktion.

SB = 40µm

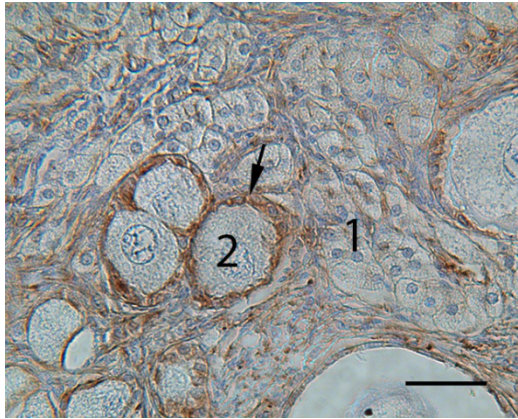


Bild 85: Ovar Katze, Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Die einschichtigen Granulosazellen (Pfeil) um die Primordialfollikel (2) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Die Thekazellen (1) sind negativ.

SB = 40 μ m

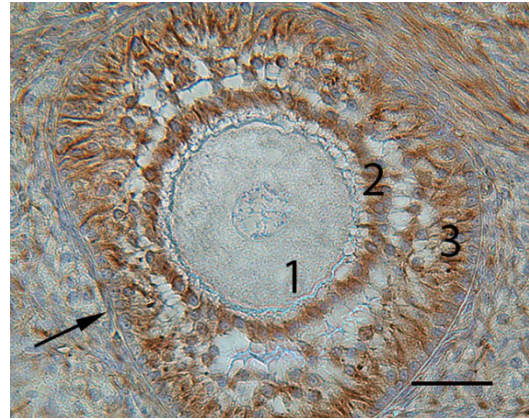


Bild 86: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Die die Eizelle (1) umgebenden Granulosazellen (2,3) weisen in ihrem Zytoplasma stark positive Reaktionen mit dem Tubulin Antikörper auf.
2 = beginnende Corona radiata,
3 = basale Schicht der Granulosazellen,
Pfeil = Basalmembran

SB= 40 μ m

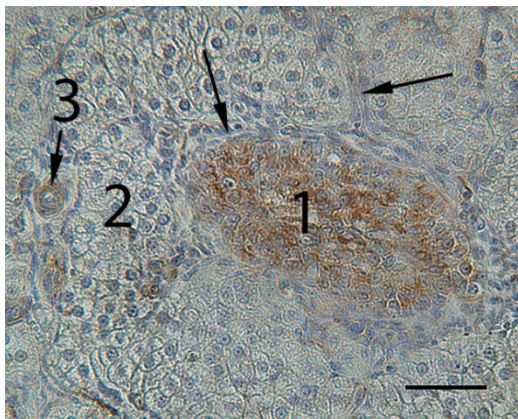


Bild 87: Ovar Katze, Thekadrüse, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Im Lumen der Thekadrüse sind Reste eines atretischen Follikels. Das ehemalige Lumen (1) ist vollständig von Zellen ausgefüllt, deren Zytoplasma deutlich positiv reagiert. Das umliegende und zwischen den Thekazellen befindliche Bindegewebe (Pfeile) zeigt keine Reaktion.
2 = Thekazellen, 3 = Blutgefäß

SB = 40 μ m

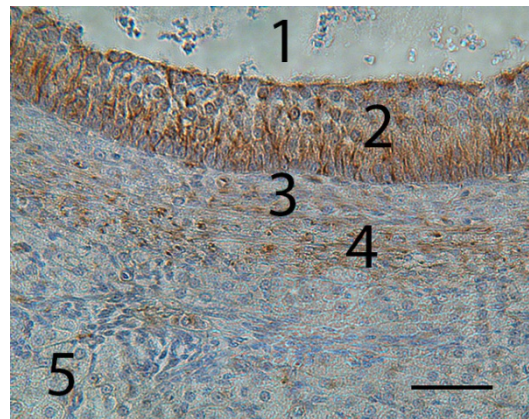


Bild 88: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Die Granulosazellschicht (2) zeigt eine starke Reaktion mit dem Tubulin-Antikörper. In der daran anschließenden Theca interna (3), aus Thekazellen und Fibrozyten reagieren nur vereinzelt Zellen, wohingegen die Zellen und Gefäße in der Theca externa (4) eine deutliche Anfärbung zeigen.
1 = Lumen, 5 = Thekazellen

SB = 40 μ m

1.3.7. SMA

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	+ (manche)	+ (manche)	+/-	+/-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	-	-	-	-	-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	-
Ti				+ (TZ-)	+
Te				++	++
CR				-	-
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	-	+++ (Endothel-) A>>V	+/-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	++	-	- (BG +++ & BGW +)	-	-

Tabelle 14: Immunhistochemischer Nachweis von SMA

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

A = Arterien, BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, TZ = Thekazellen, V = Venen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Der immunhistochemische Nachweis von SMA am feline Ovar erzielt an den die Follikel umgebenden Basalmembranen mancher Follikel schwach positive, bis deutlich positive Ergebnisse. Die Theca interna der Tertiärfollikel zeigt eine deutlich positive Reaktion aller Zellen, mit Ausnahme der Thekazellen. In der daran anschließenden Theca externa sind noch stärkere Reaktionen zu detektieren, sowohl bei den vitalen, als auch bei den atretischen Follikeln. Daher scheinen diese Zellen kontraktile Eigenschaften zu besitzen. Die stärkste Reaktion mit dem SMA-Antikörper ist in der Tunica media der Blutgefäße nachweisbar, wobei Arterien viel stärker als Venen reagieren. Je nach Lokalisation sind unterschiedliche Reaktionen des Bindegewebes zu verzeichnen.

Die in atretische Follikel eingewanderten und ihn umgebenden Bindegewebszellen und Gefäße sind stark braun angefärbt. Auch das unter dem Rete ovarii gelegene stromale Bindegewebe zeigt Reaktionen einzelner Fibrozyten und der Blutgefäße. Die in der Rinde befindlichen Fibrozyten und Fibroblasten reagieren in einigen Bereichen positiv auf den SMA-Antikörper.

Die Tunica albuginea, die Thekazellen, Luteinzellen und die Granulosazellen zeigen keine Reaktion mit dem SMA-Antikörper, also zeigen keinen Hinweis auf kontraktile Elemente.

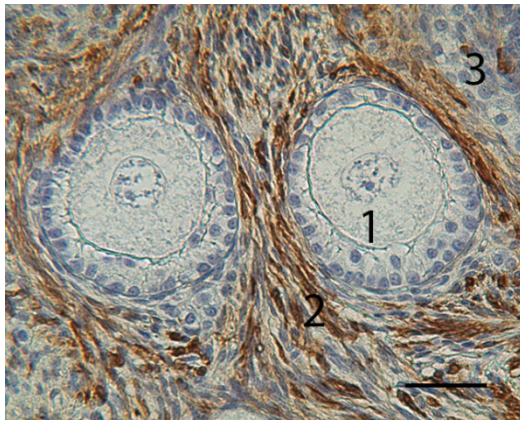


Bild 89: Ovar Katze, Primär-Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von SMA

In der Ovarrinde befinden sich zwei Follikel im Übergangsstadium vom Primär- zum Sekundärfollikel (1). Das den Follikel umgebende Bindegewebe (2) reagiert deutlich mit dem SMA-Antikörper. Die Thekazellen (3) zeigen keine Reaktion.

SB = 40 μ m



Bild 90: Ovar Katze, polyoozytärer Follikel, immunhistochemischer Nachweis von SMA

Die Eizellen (2) und das Follikelepithel (1) des polyoozytären Follikels im Übergangsstadium vom Sekundär- zum Tertiärfollikel sind negativ. Das umliegende Gewebe, welches bereits zu Thekaschichten differenziert ist, zeigt vor allem in der Theca externa (5) eine deutliche Reaktion.

3 = atretischer Follikel, 4 = Primärfollikel, 6 = Thekazellen

SB = 100 μ m

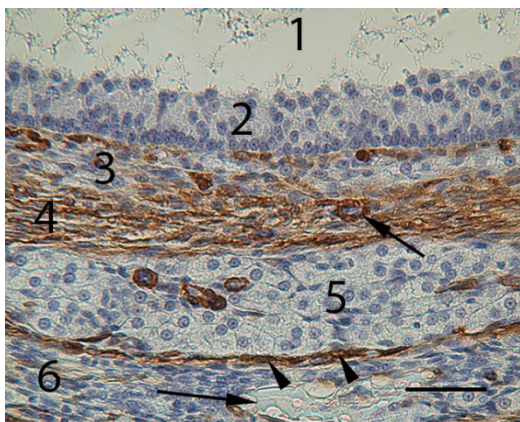


Bild 91: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von SMA

Die Granulosazellschicht (2) sowie die meisten Zellen der Theca interna (3) zeigen keine Reaktion mit dem SMA-Antikörper. Die Bindegewebszellen (4) und die Gefäße (Pfeil) der Theca externa sind stark positiv. Die umliegenden Ansammlungen von Thekazellen (5) zeigen nur in den Gefäßen sowie im sie umgebenden Bindegewebe (Pfeilspitzen) eine positive Reaktion. Der Großteil des im Ovar vorhandenen Bindegewebes (6) ist negativ.

1 = Follikelhöhle

SB = 40 μ m

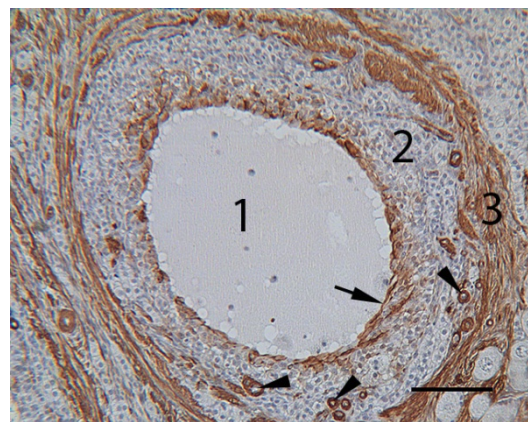


Bild 92: Ovar Katze, atretischer Follikel, immunhistochemischer Nachweis von SMA

Die zur Follikelhöhle (1) gelegenen Anteile der bereits modifizierten Follikelwand (Pfeil) reagieren positiv. In die Follikelwand sind bereits Thekazellen (2) eingewandert und auch zahlreiche Blutgefäße (Pfeilspitzen) sind dort zu finden. Die umliegende, verbreiterte Theca externa Schicht (3) zeigt eine deutliche Reaktion mit dem SMA-Antikörper.

SB = 100 μ m

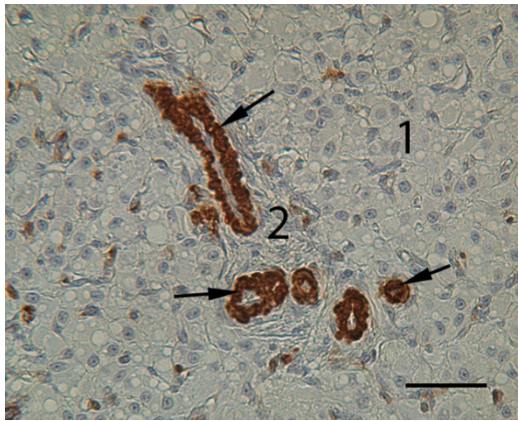


Bild 93: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von SMA

Die Granulosaluteinzellen (1) sind wie das zwischen den Luteinzellen befindliche Bindegewebe (2) vorwiegend negativ. Nur sämtliche Gefäße (Pfeile) reagieren stark positiv.

SB = 40µm

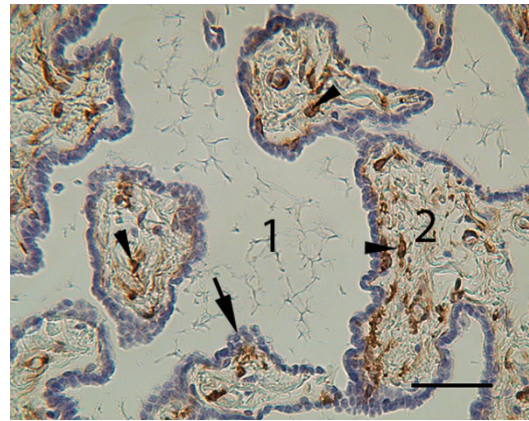


Bild 94: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von SMA

Das Epithel (Pfeil) des intraovariellen Rete zeigt keine Reaktion mit dem SMA-Antikörper. Allerdings reagieren im darunterliegenden stromalen Bindegewebe (2) liegende Gefäße (Pfeilspitzen) stark positiv.

SB = 40µm

1.3.8. S100

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	-(einzelne +)	-	-	-	-
GZ	-	-	-	-	-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	+/-	+/-
Fh				+/-	+
Ti				+++	
Te				+	
CR				-	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	+/-	++	-	- (Kapsel++)	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	- bis ++	- (+/-)	+++ (Lu-)	-	-

Tabelle 15: Immunhistochemischer Nachweis von S100

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Lu = Lumen, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Der S100 Antikörper konnte nur bei wenigen Primordialfollikeln im Ooplasma binden. Die deutlichste Reaktion erfolgte an der Theca interna, den Granulosaluteinzellen und den Thekadrüsen. Die Reaktionen des Bindegewebes waren je nach Lokalisation stark unterschiedlich. Die Tunica albuginea war in den meisten Fällen negativ, in manchen Bereichen konnte jedoch eine schwache Reaktion im Bereich unterhalb des Keimdrüsenepithels detektiert werden. Das die Primordialfollikel umgebende spinozelluläre Bindegewebe zeigt häufig eine positive Reaktion mit dem S100 Antikörper. Die zwischen den Thekadrüsen und in deren Lumen gelegenen Bindegewebsstränge sind negativ, wie auch das zwischen den Luteinzellen im Gelbkörper befindliche Bindegewebe. Lediglich die Kapsel um das Corpus luteum zeigt deutlich positive Reaktionen. Die Blutgefäße reagieren nicht mit dem S100 Antikörper, jedoch sind bei einigen im Lumen starke Reaktionen zu verzeichnen. Das Epithel des Rete ovarii ist im intraovariellen und konnektiven Teil negativ. Bei zunehmender Epithelhöhe und Dichte sind auch vereinzelt positiv reagierende Zellen zu erkennen. Im darunterliegenden stromalen Bindegewebe färben sich vereinzelte Fibrozyten an.

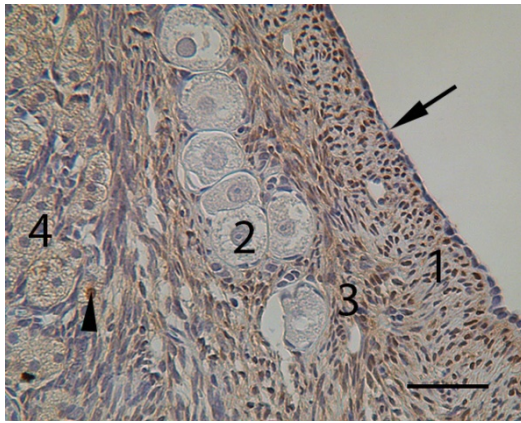


Bild 95: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von S100

Unter dem Keimdrüsenepithel (Pfeil) liegt die Tunica albuginea (1), von der einige Zellen mit dem S100-Antikörper reagieren. Das zwischen den Primordialfollikeln (2) liegende spinozelluläre Bindegewebe (3) färbt sich deutlich an. Im Zytoplasma der Thekazellen (4) sieht man deutlich positive Reaktionen. Auch einzelne Zellkerne (Pfeilspitze) färben sich deutlich an.

SB = 40µm

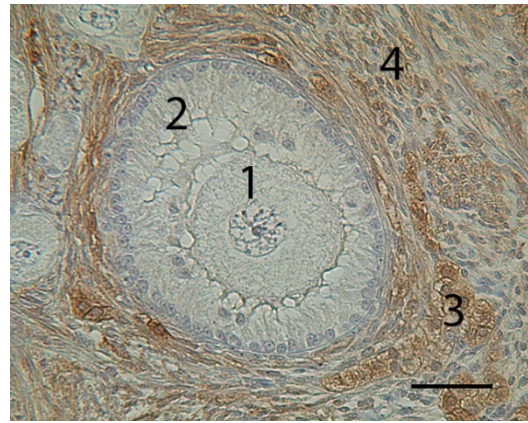


Bild 96: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von S100

Die um den Sekundärfollikel gelegenen Thekazellen (3) zeigen eine stark positive Reaktion des Zytoplasmas. Die umliegenden Bindegewebszellen (4) reagieren nur schwach.

1 = Oocyte, 2 = Granulosazellschicht

SB = 40µm

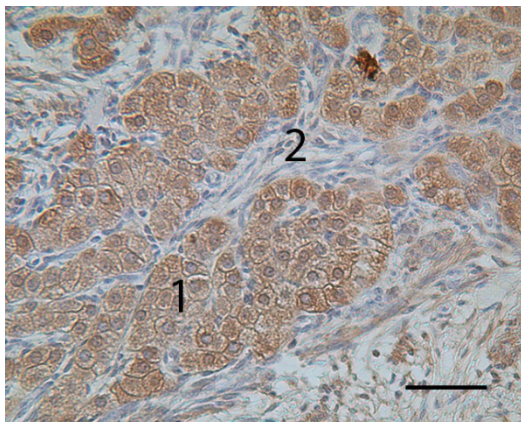


Bild 97: Ovar Katze, Thekadrüse, immunhistochemischer Nachweis von S100

Das im Zentrum der Thekadrüsen gelegene Bindegewebe (2) zeigt keine Reaktion mit dem S100-Antikörper. Das Zytoplasma der Thekazellen (1) reagiert stark positiv.

SB = 40µm

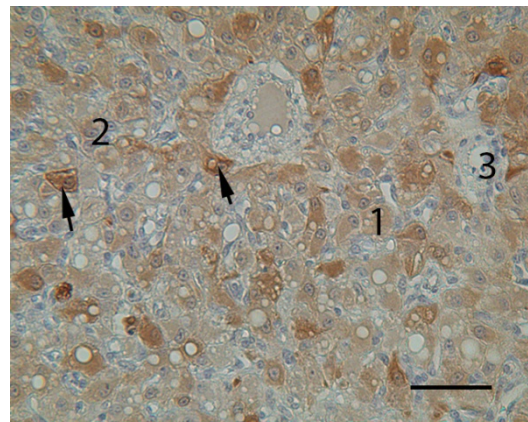


Bild 98: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von S100

Die Granulosaluteinzellen (1) reagieren in ihrem Zytoplasma positiv. Zwischen diesen sind auch einige große Luteinzellen, die sich stark positiv anfärben (Pfeile). Die Thekaluteinzellen (2) färben sich deutlich schwächer an. Auch das dazwischen liegende Bindegewebe und die Gefäße (3) reagieren nicht mit dem S100-Antikörper.

SB = 40µm

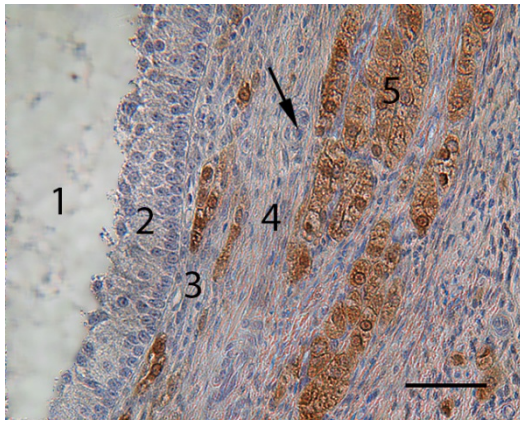


Bild 99: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von S100

In sämtlichen Wandschichten des Tertiärfollikels ist keine Reaktion nachzuweisen, außer in den Thekazellen der Theca interna (3), oder der an den Follikel anschließenden Schichten von Thekazellen (5). Lediglich in der Theca externa (4) kann man evtl. eine schwache Reaktion erahnen. 1 = Follikelhöhle, 2 = Granulosazellschicht
Pfeil = Blutgefäß

SB= 40µm

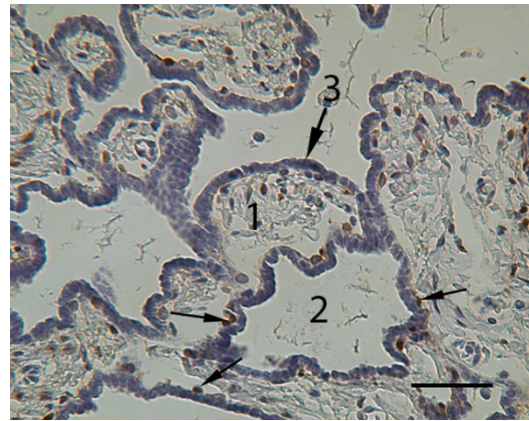


Bild 100: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von S100

Das Epithel (3) des intraovariellen Rete zeigt keine Reaktion mit dem S100-Antikörper. Im stromalen Bindegewebe (1) reagieren vereinzelte Zellkerne (Pfeile).
2 = Lumen

SB = 40µm

1.3.9. Connexin 43

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	- (vereinzelt+)	+	++	++ (gr. Follikel z.T.-)	+/-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	-
Ti				++	++
Te				-	-
CR				++	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	+/-	+ (ZM+++)	-	-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	-	-	++	-	-

Tabelle 16: Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Legende: - = negativ, +/- = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, gr. = große, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZM = Zellmembran, ZP = Zona pellucida

Der immunhistochemische Nachweis von Connexin 43 zeigt eine Reaktion in den Granulosazellen der Follikel, die mit fortschreitendem Wachstum des Follikels auch an Intensität zunimmt. Die Zellkerne zeigen keine Reaktion, nur das Zytoplasma färbt sich deutlich braun an. Im Zytoplasma selbst sind auch Bereiche, die sehr stark positiv reagieren, zu finden. Diese Bereiche sind häufig perinukleär lokalisiert oder befinden sich entlang der Plasmamembran. Neben den Granulosazellen bindet der Connexin 43 Antikörper auch an die Thekazellen, welche im Ovar in der Theca interna Schicht als einzelne Zellen im Ovargewebe oder in Form von Thekadrüsen organisiert vorkommen. Deren Reaktion ist ähnlich der, der Granulosazellen in den Tertiärfollikeln. Eine starke Reaktion ist im Zytoplasma in Form stark positiver punktförmiger Areale zu sehen. Auch im Gelbkörper lässt sich eine Reaktion des Zytoplasmas der Granulosaluteinzellen detektieren, die jedoch etwas schwächer als bei den beiden oben genannten ausfällt. An einigen der Granulosaluteinzellen werden im Bereich der Zellmembran bzw. der Zell-Zell-Kontakte sehr starke Reaktionen sichtbar.

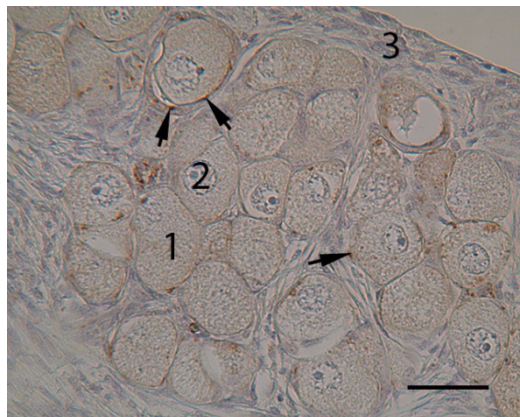


Bild 101: Ovar Katze, Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

In der Ovarrinde sind zahlreiche Primordialfollikel (1), deren Follikelepithel (Pfeile) schwache Reaktionen zeigt. In dem umliegenden Bindegewebe und der Tunica albuginea (3) ist keine Reaktion nachweisbar. 2 = Nukleus mit Nukleolus

SB = 40µm

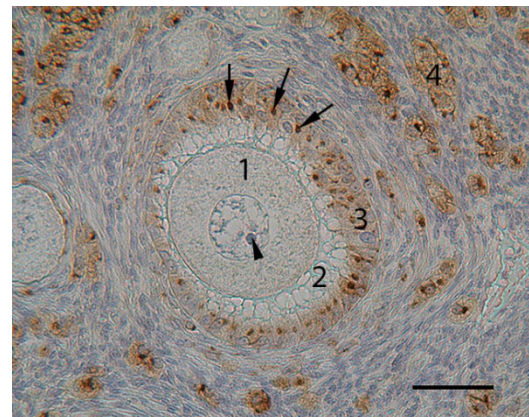


Bild 102: Ovar Katze, Primär-/Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Die Granulosazellen (3) des Follikels weisen in ihrem Zytoplasma eine deutliche Reaktion mit dem Connexin 43 Antikörper auf. Punktförmige Bereiche im Zytoplasma (Pfeile) färben sich stark an.

1 = Oocyte, 2 = Zona pellucida, 4 = Thekazellen, Pfeilspitze = Nukleolus

SB = 40µm

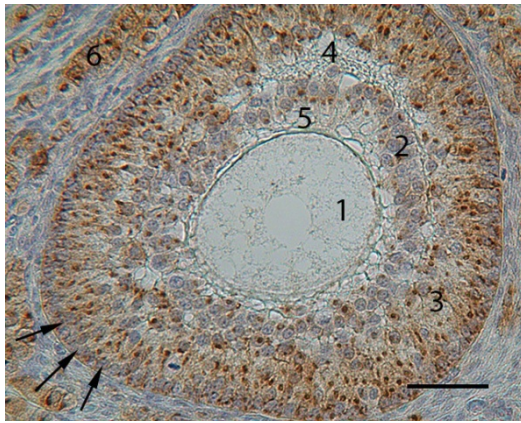


Bild 103: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Das Zytoplasma der Granulosazellschicht (3) reagiert deutlich mit dem Connexin 43 Antikörper. Die Anfärbung erscheint besonders intensiv, in Form von punktförmigen perinukleären Bereichen im Zytoplasma. Das Zytoplasma der Corona radiata Zellen (2) zeigt ebenso dieses Anfärbeverhalten.

1 = Oozyte, 4 = beginnendes Antrum folliculi, 5 = Zona pellucida, Pfeile = Kerne der basalen Schicht der Granulosazellen, 6 = Thekazellen
SB = 40µm

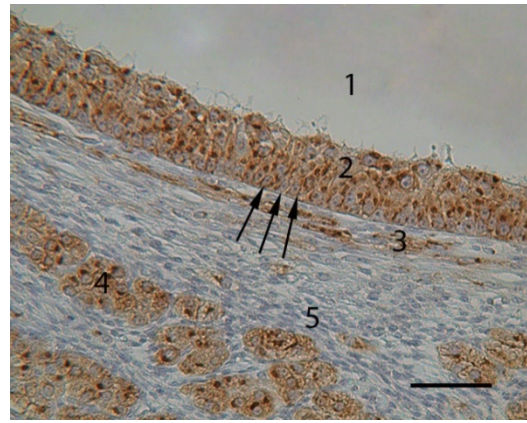


Bild 104: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Die Granulosazellschicht (2) des Tertiärfollikels zeigt ein stark positives Zytoplasma mit sehr stark positiven punktförmigen Einschlüssen. Das Anfärbeverhalten der Thekazellen (4) ist analog zu dem der Granulosazellen. 1 = Antrum folliculi, 3 = Theca interna mit einzelnen positiven Thekazellen, 5 = Bindegewebe, Pfeile = Basalmembran

SB = 40µm

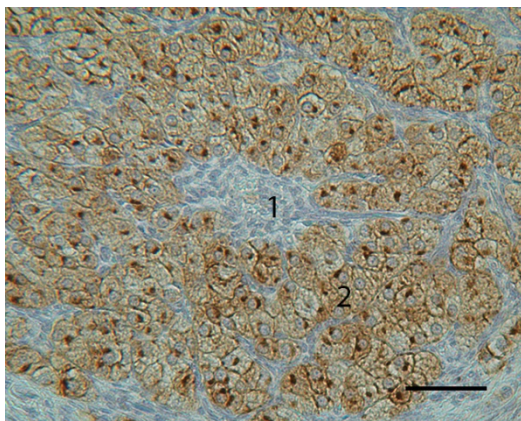


Bild 105: Ovar Katze, Thekadrüsen, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Das im Zentrum der Thekadrüsen gelegene Bindegewebe (1) zeigt keine Reaktion mit dem Connexin 43 Antikörper. Das Zytoplasma der Thekazellen (2) reagiert stark positiv. Punktförmige Bereiche im Zytoplasma färben sich deutlich stärker als der Rest.

SB = 40µm

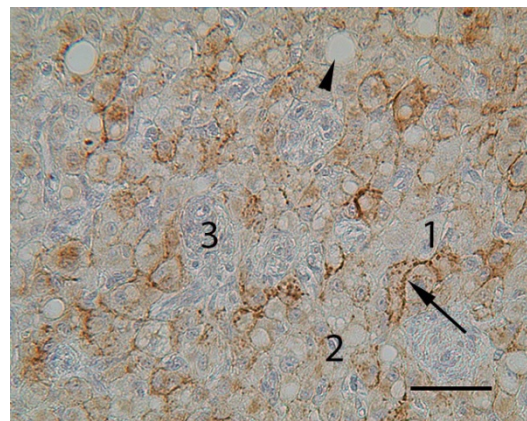


Bild 106: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Die Granulosaluteinzellen (1) zeigen eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma. Deutlicher fällt die Reaktion direkt entlang der Zellmembran (Pfeil) der Luteinzellen aus, an den Zell-Zell-Verbindungen. Die Thekaluteinzellen (2) zeigen keine oder nur schwache Reaktionen. Die Gefäße und das sie umgebende Bindegewebe (3) sind negativ.

SB = 40µm

1.3.10. Progesteron-Rezeptor

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	-	-	-	-	-
ZK	-	-	-	-	-
ZP			-	-	-
Fh			-	-	-
Ti				-	
Te				++	
CR				-	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	+ - (ZK)	+ - (CP)	-	+ (ZK)	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	- (ZK+)	-	-	- (vereinzelt ZK+)	-

Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptoren

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CP = Zytoplasma, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Die stärkste Reaktion bei den immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Progesteron-Rezeptor-Antikörper wurde in der Theca externa Schicht detektiert. Die in den äußersten Wandschichten des Tertiärfollikels befindlichen Fibrozyten zeigen eine deutliche Braunfärbung ihrer Zellkerne. Das umliegende spinozelluläre Bindegewebe zeigt auch eine positive nukleäre immunhistochemische Reaktion. Auch im Corpus luteum zeigt sich eine schwache Reaktion des Zytoplasmas der Granulosaluteinzellen. Deutlich stärker färben sich die Zellkerne einzelner Thekaluteinzellen und Bindegewebszellen an. Auch im Zentrum der Thekadrüsen ist eine deutliche Reaktion der meisten Fibrozytenkerne zu verzeichnen. Das Rete ovarii weist einige Epithelzellen auf, an deren Nuklei der Progesteron-Rezeptor-Antikörper bindet. Es reagieren nicht alle, sondern nur vereinzelte Epithelzellkerne.

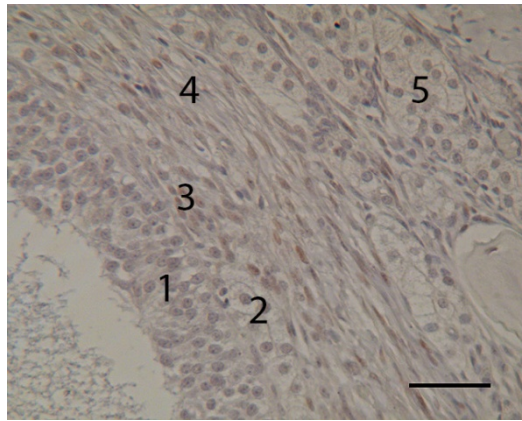


Bild 107: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptoren

In der Tertiärfollikelwand reagieren primär die Zellen der Thekaschichten. Die Thekazellen (2) der Theca interna sind negativ, die dazwischen liegenden Fibrozyten (3) zeigen eine deutliche nukleäre Reaktion. Auch die Bindegewebszellen der Theca externa (4) zeigen im Nukleus eine deutlich positive Reaktion.

1 = Granulosazellschicht, 5 = Thekazellen,

SB = 40µm

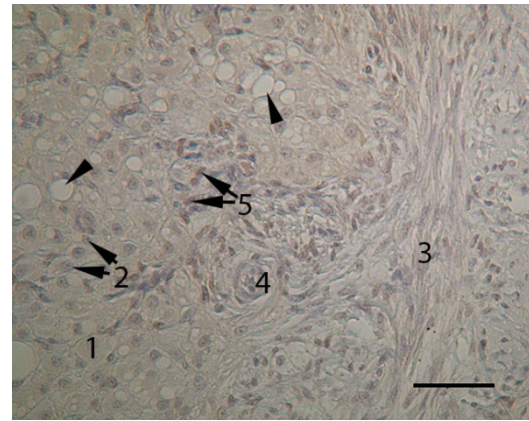


Bild 108: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptoren

Das Zytoplasma der Granulosaluteinzellen (1) zeigt eine schwache Reaktion. Die Zellkerne (2) reagieren nicht mit dem Antikörper gegen den Progesteron-Rezeptor. Die Zellkerne einzelner Thekaluteinzellen (5) reagieren deutlich positiv. Die den Gelbkörper umgebende bindegewebige Kapsel (3) zeigt keine oder nur schwache Reaktionen.

4 = Blutgefäß, Pfeilspitzen = Vakuolen

SB = 40µm

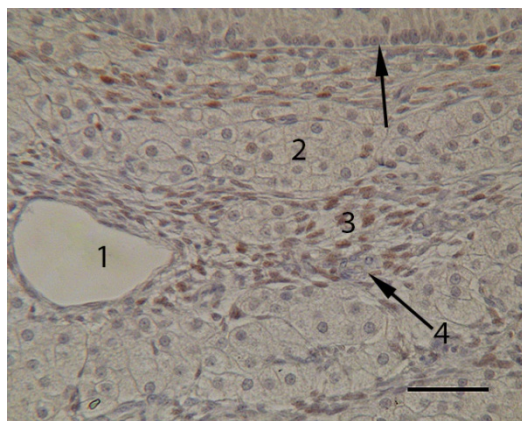


Bild 109: Ovar Katze, Thekadrüsen, immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptoren

Die Thekazellen (2) zeigen keine Reaktion, weder im Zytoplasma, noch im Nukleus. Das im Zentrum der Drüse angeordnete Bindegewebe (3) zeigt in den Nuklei deutlich positive Reaktionen.

1 = Gefäß, 4 = Blutgefäß, Pfeil = Basalmembran

SB = 40µm

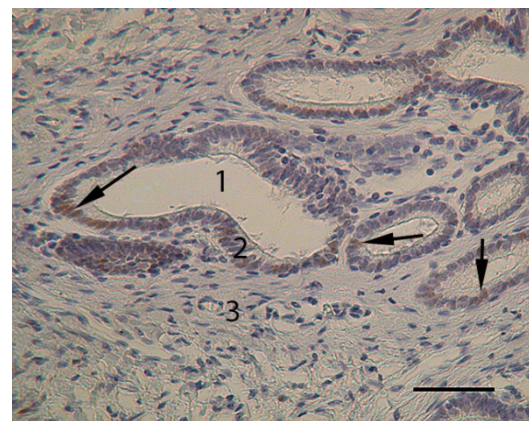


Bild 110: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptoren

Das Epithel (2) des Rete ovarii zeigt einzelne Zellen, deren Zellkerne deutlich mit dem Progesteron-Rezeptor-Antikörper reagieren (Pfeile), neben anderen, die keinerlei Reaktion zeigen.

1 = Lumen, 3 = Stroma

SB = 40µm

1.3.11. Östrogen-Rezeptor (ER α)

Zellart/ Gewebe	Primordial- follikel	Primär- follikel	Sekundär- follikel	Tertiär- follikel	Atretischer Follikel
BSM	-	-	-	-	-
Oo	-	-	-	-	-
GZ	- (wenige++)	-	-	-	-
ZK	- (vereinzelt+)	-	- (vereinzelt+)	-	- (vereinzelt+)
ZP			-	-	-
Fh				-	-
Ti				-	
Te				-	
CR				-	
GK	TL	GL	BG	BGW	
	-	-	-	-	
Sonstiges Gewebe	BGW	TA	TD	Rete	KDE
	-	-	-	+	+ (Übergang zum Mesovar++)

Tabelle 18: Immunhistochemischer Nachweis von ER α

Legende: - = negativ, -/+ = schwach positiv, + = deutlich positiv, ++ = stark positiv, +++ = sehr stark positiv

BG = Blutgefäße, BGW = Bindegewebe, BSM = Basalmembran, CR = Corona radiata, Fh = Follikelhöhle, GK = Gelbkörper, GL = Granulosaluteinzellen, GZ = Granulosazellen, KDE = Keimdrüsenepithel, Oo = Ooplasma, TA = Tunica albuginea, TD = Thekadrüsen, Te = Theca externa, Ti = Theca interna, TL = Thekaluteinzellen, ZK = Zellkern, ZP = Zona pellucida

Die Untersuchungen mit dem ER α -Antikörper ergaben eine positive Reaktion in

den Zellkernen des Keimdrüsenepithels, vor allem am Übergang zum Mesovar. Die Reaktion am Keimdrüsenepithel war je nach Lokalisation unterschiedlich stark. In der Ovarrinde reagierte das Follikelepithel einzelner Primordialfollikel. Die Zellkerne der Granulosazellen zeigten eine deutliche Braunfärbung. Die meisten Follikel jedoch zeigten keine Reaktion mit dem Östrogen-Rezeptor-Antikörper. In einzelnen Eizellen war eine positive Reaktion im Zellkern zu erkennen. Bei den meisten Oozyten wurde jedoch keine Reaktion nachgewiesen. Im Rete ovarii war auch ein Ansprechen des Epithels auf den ER α -Antikörper zu beobachten. Es reagierten nur die Zellkerne einiger Epithelzellen. Die Anzahl der positiven Nuklei nahm vom flachen zum hochprismatischen Epithel zu.

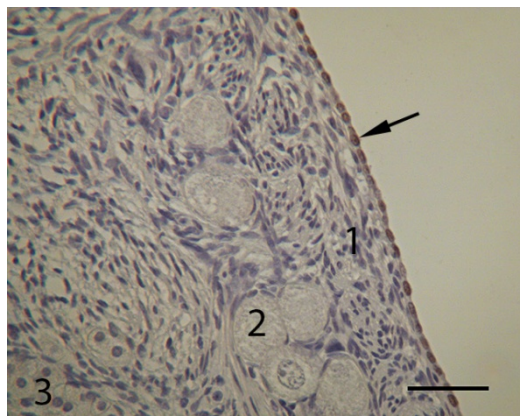


Bild 111: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von ER α

Das Keimdrüsenepithel (Pfeil) zeigt in den Zellkernen eine deutlich positive Reaktion mit dem ER α -Antikörper. Sämtliche andere Strukturen in der Ovarrinde sind negativ.

- 1 = Keimdrüsenepithel,
- 2 = Primordialfollikel,
- 3 = Thekazellen

SB = 40 μ m

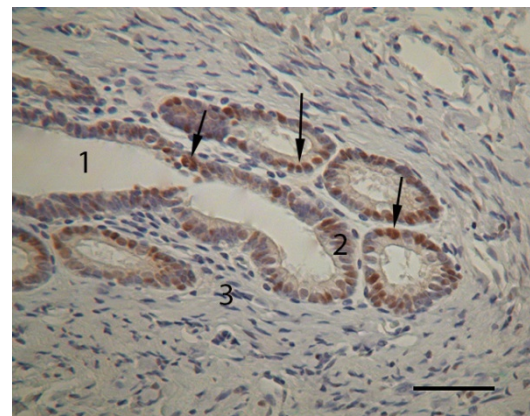


Bild 112: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von ER α

In dem ein- bis mehrschichtigen iso- bis hochprismatischen Epithel (2) des Rete ovarii reagieren einige Zellkerne (Pfeile) mit dem ER α -Antikörper. Andere Zellkerne des Epithels zeigen keine Reaktion.

- 1 = Lumen, 3 = Stroma

SB = 40 μ m

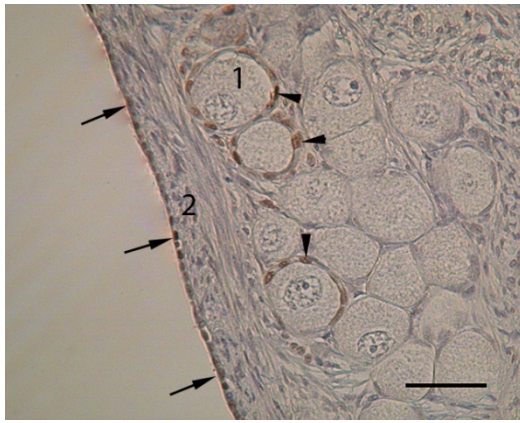


Bild 113: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von ER α

Neben der positiven Reaktion im Keimdrüsenepithel (Pfeile) lässt sich auch eine stark positive Reaktion in den Nuklei (Pfeilspitzen) der Granulosazellen der Primordialfollikel (1) detektieren. Andere Follikelepithelzellen sind negativ.
2 = Tunica albuginea

SB = 40 μ m

2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

2.1. Ultrastruktur der Primordial- und der Primärfollikel

Die zahlreich in der Ovarrinde vorkommenden Primordialfollikel haben einen Durchmesser von 20-30µm. In den meisten Anschnitten erscheinen sie leicht längsoval. Sie werden von einer 300-500nm starken elektronendichten Basalmembran zum umliegenden Gewebe abgegrenzt. Der Primordialfollikel besteht zum einen aus der Eizelle selbst und den umliegenden flachen (1-3µm dicken), zytoplasmaarmen Granulosazellen. Diese nehmen beim Übergang zum Primärfollikel eine isoprismatische Gestalt an. Die Oozyten besitzen ein meist homogenes Zytoplasma von geringer Elektronendichte, in dem zahlreiche Zellorganellen enthalten sind. Häufig vorkommende paraplasmatische Einschlüsse sind die Fettvakuolen, deren Größe von etwa 1-5µm variiert. Sie weisen eine sehr geringe Elektronendichte auf und sind in großer Anzahl in allen untersuchten Eizellen zu finden. Lipidtropfen, die zwischen 500 und 1000nm Durchmesser aufweisen kommen deutlich seltener im Ooplasma der Primordialfollikel vor. Ebenso finden sich im Zytoplasma zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ, deren Größe im Querschnitt etwa 200-400nm beträgt. Die meisten Mitochondrienanschnitte stellen sich rund oder längsoval dar, daneben sind vereinzelt langgezogene Anschnitte zu erkennen. Außerdem befinden sich zahlreiche Vakuolen mit relativ elektronendichtem Inhalt im Ooplasma. Deren Durchmesser beträgt etwa 500-1000nm. Direkt unter dem Oolemm kann man etwa 100nm dicke runde, „electrondensebodies“ erkennen. Auch Glykogengranula und gelegentlich auch multivesikuläre Körperchen sind im Ooplasma zu finden. Der Nukleus besteht vorwiegend aus Euchromatin und die ausgebildeten Kernporen ermöglichen einen intensiven Austausch von Stoffen zwischen Karyoplasma und Zytoplasma. Die Granulosazellen sind mit der Oozyte in den meisten Bereichen eng durch Interdigitationen und „liningbodies“ (Transosomen) verzahnt. Bei den im Wachstum befindlichen Follikeln sind ferner vermehrt „gapjunctions“ zu erkennen. Das Zytoplasma der flachen Granulosazellen ist meist von geringerer Elektronendichte, als das Ooplasma. Selten finden sich auch dunkle Granulosazellen, deren Zytoplasma deutlich elektronendichter als das Ooplasma ist. Der Nukleus ist euchromatinreich und in diesem Follikelstadium von

langgezogener Gestalt. In einigen Granulosazellen ist ein Nukleolus von etwa 1µm Durchmesser zu erkennen. Im Zytoplasma befinden sich Mitochondrien vom Crista-Typ, vereinzelte Lipidtropfen, Vakuolen und Lysosomen sowie ein in diesem Stadium schwach ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplexe. Selten findet man auch multilamelläre Körperchen im Zytoplasma vereinzelter Granulosazellen.

Die ultrastrukturelle Analyse der Primärfollikel zeigt im Vergleich zu den Primordialfollikeln deutlich aktivere Granulosazellen, die zwischenzeitlich eine isoprismatische Form angenommen haben und einen runden Zellkern besitzen. Auch die Zellorganellen haben sich vermehrt und es sind nun deutlich mehr Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum zu finden. Zwischen den Granulosazellen und dem Oolemn ist bereits eine noch dünne etwa 3-4µm breite Schicht aus Glykoproteinen zu erkennen, welche die beginnende Bildung der Zona pellucida anzeigt. Auch die Oozyte vergrößert sich und im Ooplasma sind vorwiegend Vakuolen, Mitochondrien vom Crista-Typ und Anteile des endoplasmatischen Retikulums zu erkennen. Im Vergleich zu den Primordialfollikeln ist der Golgi-Apparat bedeutend prominenter ausgebildet und es sind häufig mehrere Dictyosomen zu erkennen. Die Granulosazellen untereinander sind auch durch Interdigitationen und Transosomen sowie durch „gapjunctions“ verbunden. Daneben finden sich bei den Primärfollikeln Projektionen der Granulosazellen in den subkortikalen Bereichen der Oozyte, sowie in den Granulosazellen ebenso Fortsätze der Oozyte zu erahnen sind. Das an die Basalmembran angrenzende Gewebe besteht vorwiegend aus Fibroblasten, Fibrozyten und Thekazellen.

Die Fibroblasten besitzen einen langgezogenen Nukleus mit einem oder zwei gut erkennbaren Nukleoli von etwa 800-1600nm Durchmesser. Diese besitzen meist zentral ein helles fibrilläres Zentrum, welches von einem Ring elektronendichteren Materials umgeben wird. Das Heterochromatin ist meist entlang der inneren Kernlamina angeordnet und wird von zahlreichen Kernporen durchbrochen. Das Zytoplasma enthält vorwiegend raues endoplasmatisches Retikulum, Vakuolen und wenige Mitochondrien.

Die Thekazellen besitzen einen deutlich größeren Nukleus mit wenig Heterochromatin und einem häufig zu erkennenden elektronendichten Nukleolus, der in manchen Zellen auch ein helles Zentrum aufweist. Im Zytoplasma befindet

sich raues endoplasmatisches Retikulum und der Golgi-Apparat ist meist gut ausgeprägt.

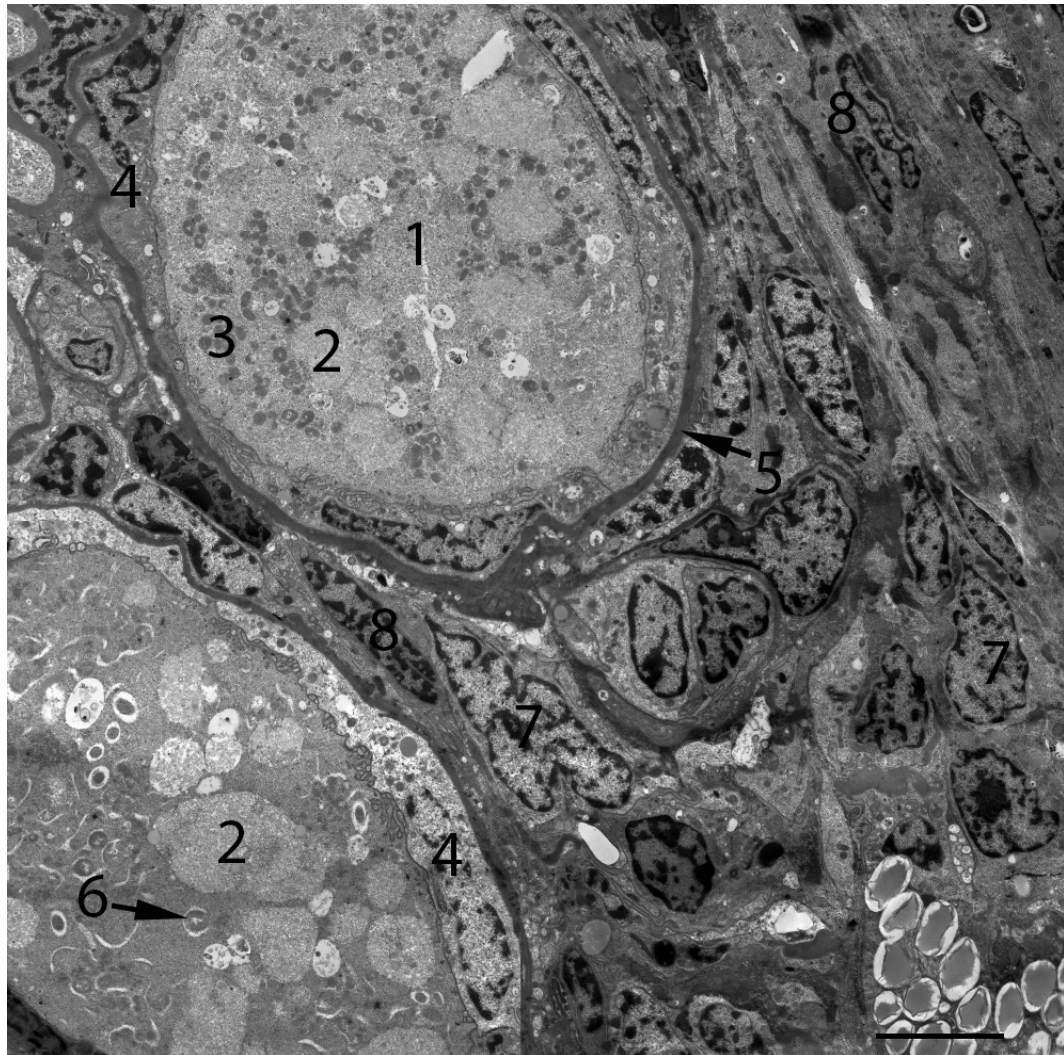


Bild 114: Ovar Katze, Primordialfollikel in der Ovarrinde, EM

Die zwei Primordialfollikel besitzen in ihrem Ooplasma (1) zahlreiche Mitochondrien (3), Fettvakuolen (2) und Vakuolen (6). Die Eizelle ist mit den Granulosazellen (4) durch zahlreiche Interdigitationen verzahnt. Die Basalmembran (5) grenzt den Follikel vom umliegenden Gewebe ab.

1 = Ooplasma, 2 = Fettvakuolen, 3 = Mitochondrien, 4 = Granulosazellen, 5 = Basalmembran, 6 = Vakuole, 7 = Thekazellen, 8 = Fibroblasten

SB=5µm

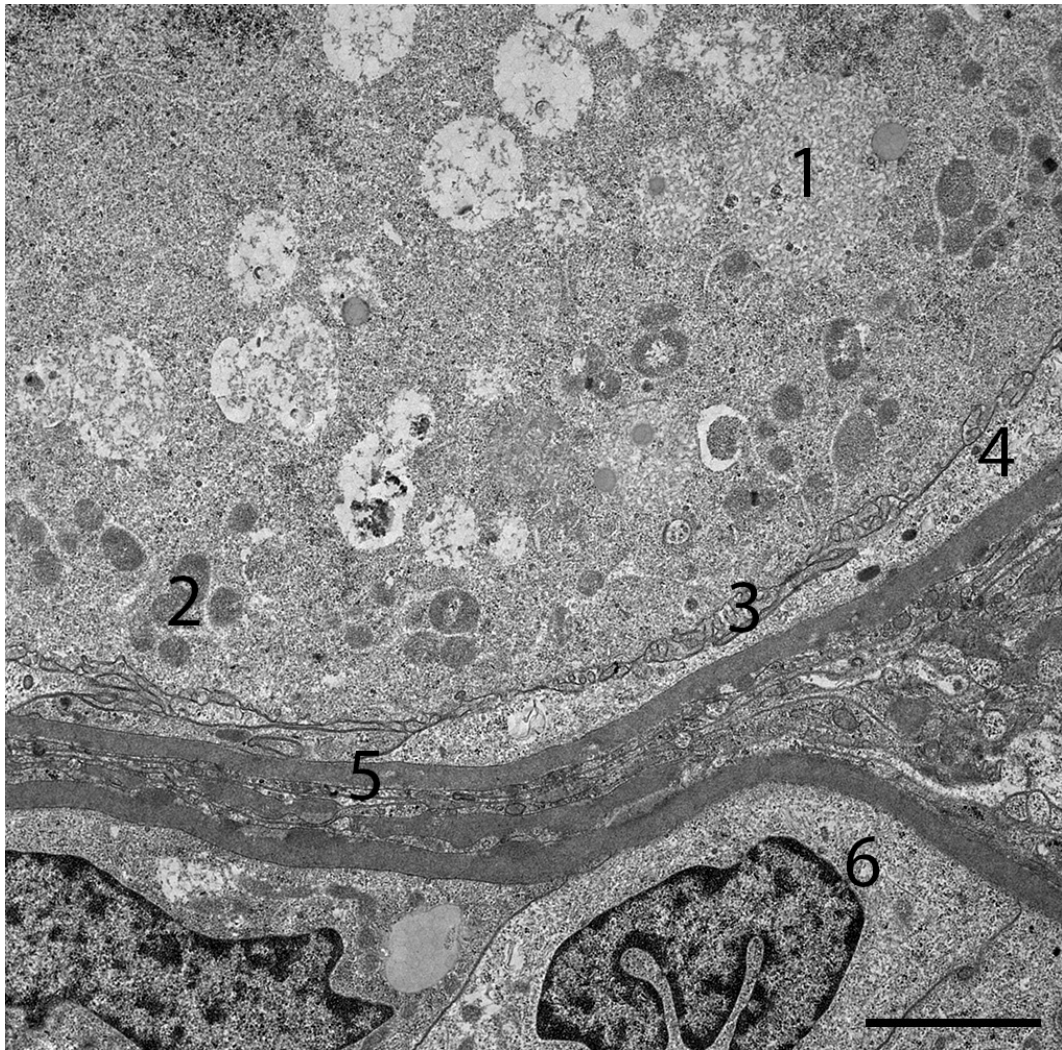


Bild 115: Ovar Katze, Primordial- und beginnender Primärfollikel, EM

Im Ooplasma des Primordialfollikels sind einige Fettvakuolen (1) und Vakuolen (2) zu erkennen. Die Oozyte ist mit dem Zytoplasma der Granulosazelle durch Interdigitationen (3) verbunden. Die Basalmembran (5) grenzt den Follikel zum umliegenden Gewebe ab. Der daran anschließende Follikel beginnt sich weiter zu differenzieren und die ihn umgebenden Granulosazellen (6) wandeln sich von flachen zu isoprismatischen Zellen um.

1 = Fettvakuolen, 2 = Vakuolen, 3 = Interdigitationen, 4 = Zytoplasma einer Granulosazelle, 5 = Basalmembran, 6 = Granulosazelle des beginnenden Primärfollikels

SB=2,5µm

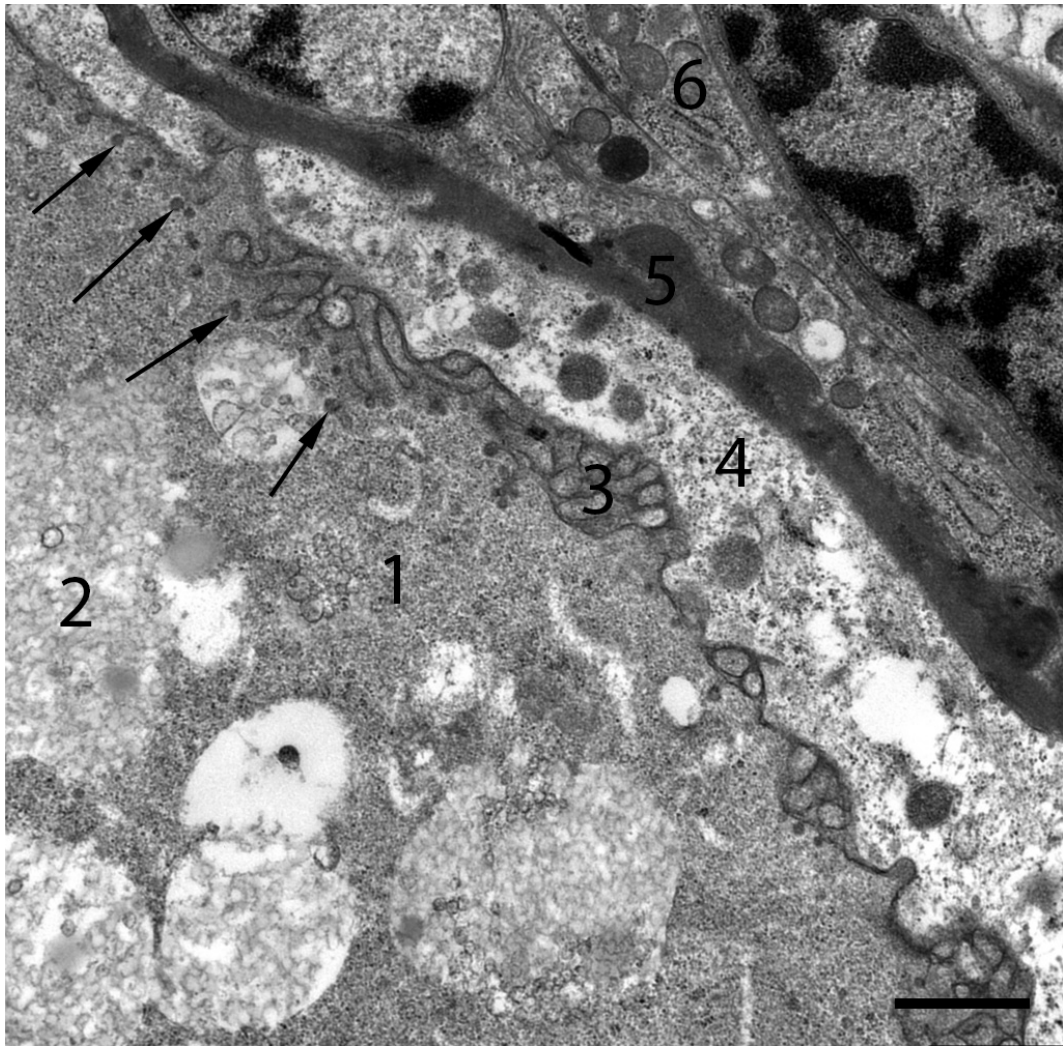


Bild 116: Ovar Katze, Primordialfollikelwand, EM

Die Eizelle enthält in ihrem Ooplasma (1) zahlreiche Fettvakuolen (2) und unter dem Oolemm, das mit der Granulosazelle (4) durch zahlreiche Interdigitationen (3) verbunden ist befinden sich entlang der Zellmembran „electron dense bodies“ (Pfeile).

1 = Ooplasma, 2 = Fettvakuole, 3 = Interdigitationen, 4 = Granulosazelle,
5 = Basalmembran, 6 = Fibroblast, Pfeile = „electron dense bodies“

SB=1 μ m

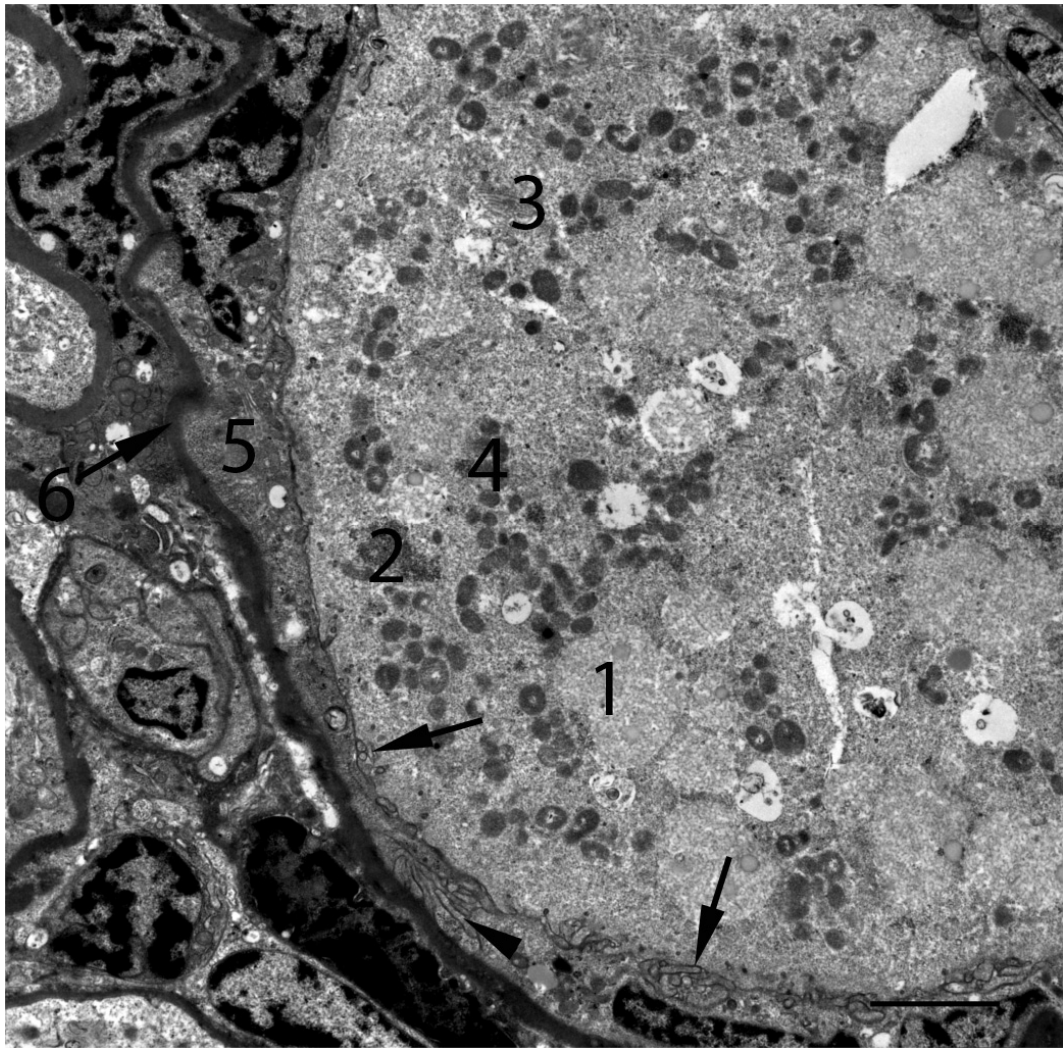


Bild 117: Ovar Katze, Primordialfollikel, EM

Im Ooplasma befinden sich zahlreiche Fettvakuolen (1), Mitochondrien (4), Glykogengranula (2) und auch Anteile des Golgi-Apparates (3). Die in Falten gelegt Basalmembran (6) umschließt den gesamten Follikel mit den Granulosazellen (5).

1 = Fettvakuole, 2 = Glykogengranula, 3 = Golgi Komplex, 4 = Mitochondrien vom Crista-Typ, 5 = Zytoplasma der Granulosazelle, 6 = Basalmembran, Pfeile = Interdigitationen zwischen Oozyte und Granulosazelle, Pfeilspitze = Interdigitationen zwischen zwei Granulosazellen

SB = 2,5µm

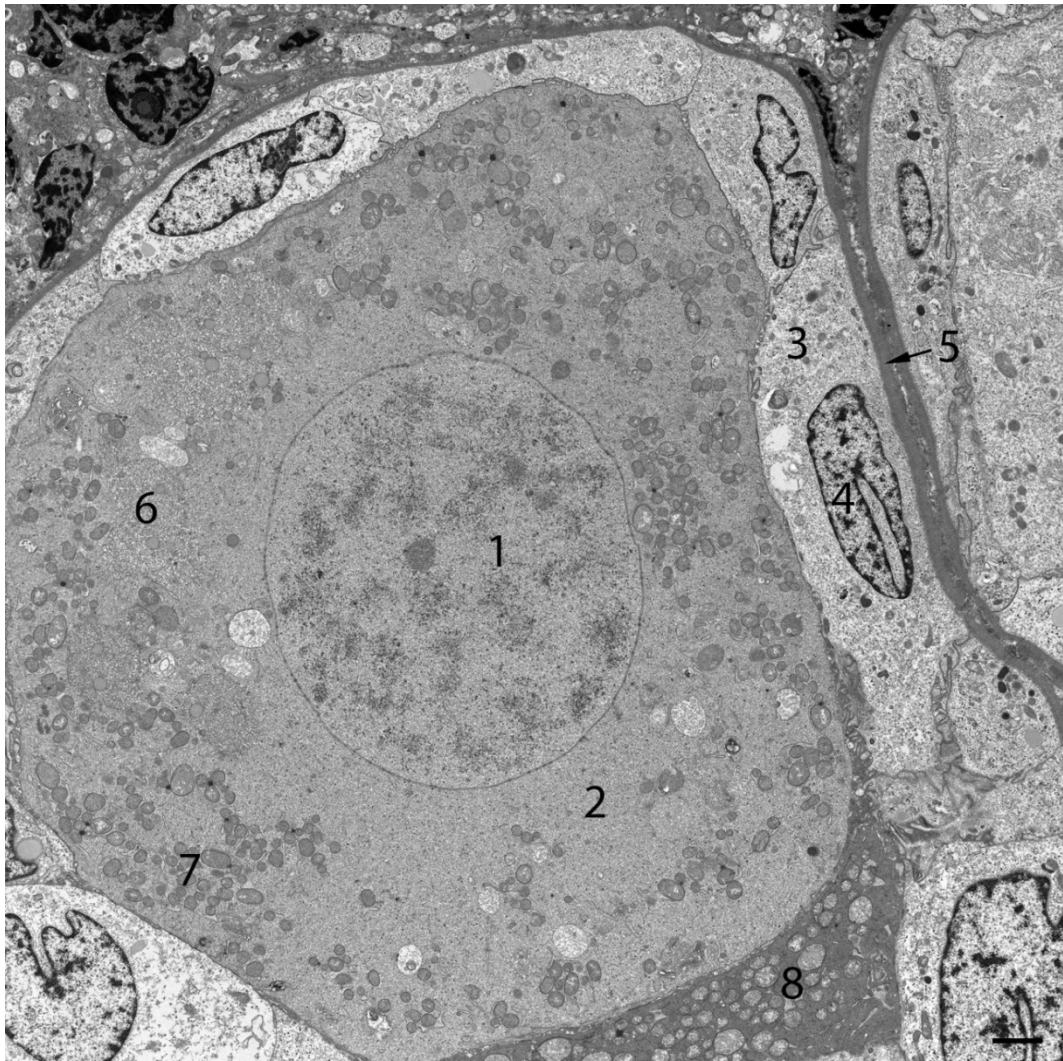


Bild 118: Ovar Katze, Primordialfollikel, Übergang zum Primärfollikel, EM

Die Oozyte besitzt in ihrem Ooplasma (2) zahlreiche Mitochondrien (7) und Fettvakuolen (6). Der runde zentral gelegene Nukleus (1) ist reich an Euchromatin und besitzt einen kleinen Nukleolus.

Die Granulosazellen (3), die nach außen an die Oozyte anschließen beginnen sich weiter zu differenzieren und der Zellkern (4) ist nicht mehr so langgezogen wie in den vorherigen Primordialfollikeln.

An die Basalmembran (5) schließt die Basalmembran des nächsten Follikels an.

1 = Nukleus, 2 = Ooplasma, 3 = Zytoplasma der Granulosazelle, 4 = Nukleus der Granulosazelle, 5 = Basalmembran, 6 = Fettvakuole, 7 = Mitochondrien, 8 = dunkle Granulosazelle

SB = 2µm

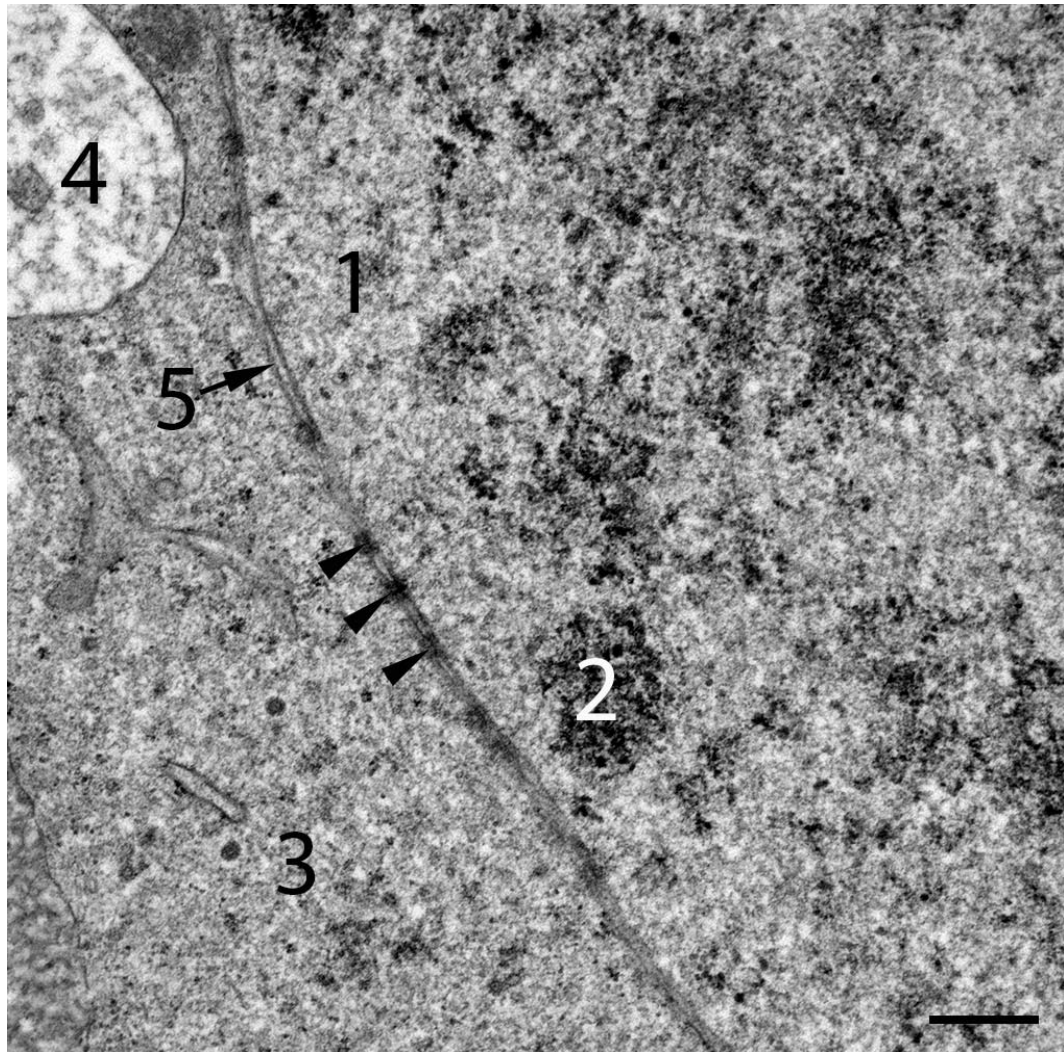


Bild 119: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 118, EM

In dem euchromatinreichen Nukleus (1) ist nur wenig Heterochromatin (2) zu erkennen. Die Kernmembran (5) aus innerer und äußerer Kernmembran mit dem dazwischenliegenden perinukleären Raum ist durch mehrere Kernporen (Pfeilspitzen) unterbrochen, die eine Verbindung zum Ooplasma (3) gewährleisten.

1 = Euchromatin, 2 = Heterochromatin, 3 = Ooplasma, 4 = Fettvakuole,
5 = Kernmembran, Pfeilspitzen = Kernporen

SB = 500nm

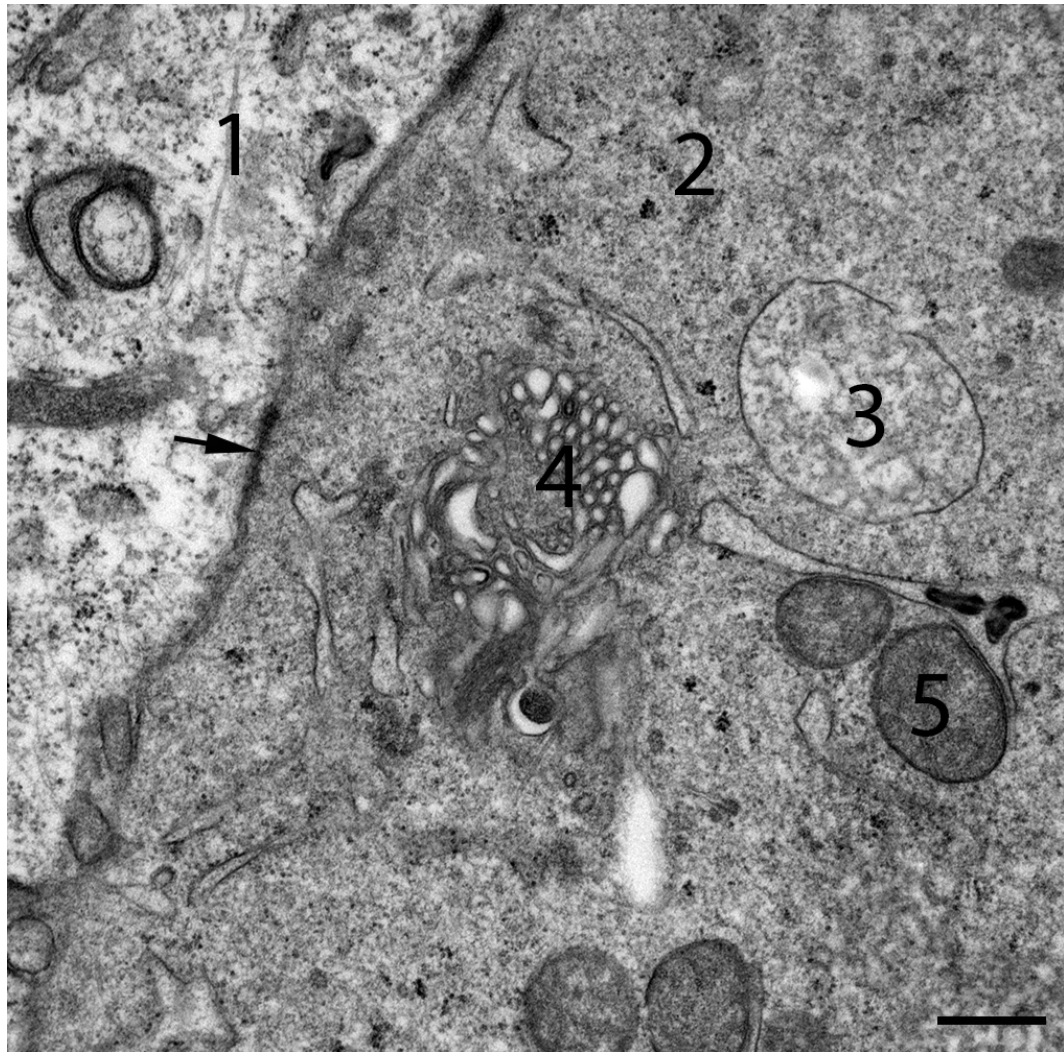


Bild 120: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 118, EM

Zwischen der Oozyte und den Granulosazellen (1) sind neben Interdigitationen auch zahlreiche „gapjunctions“ (Pfeil) zu erkennen. Der Golgi-Apparat (4) ist sehr deutlich unter dem Oolemn ausgebildet. Auch zahlreiche Fettvakuolen (3) und Mitochondrien (5) befinden sich im Ooplasma (2).

1 = Zytoplasma der Granulosazellen, 2 = Ooplasma, 3 = Fettvakuole, 4 = Golgi-Apparat, 5 = Mitochondrien, Pfeil = „gapjunction“

SB = 500nm

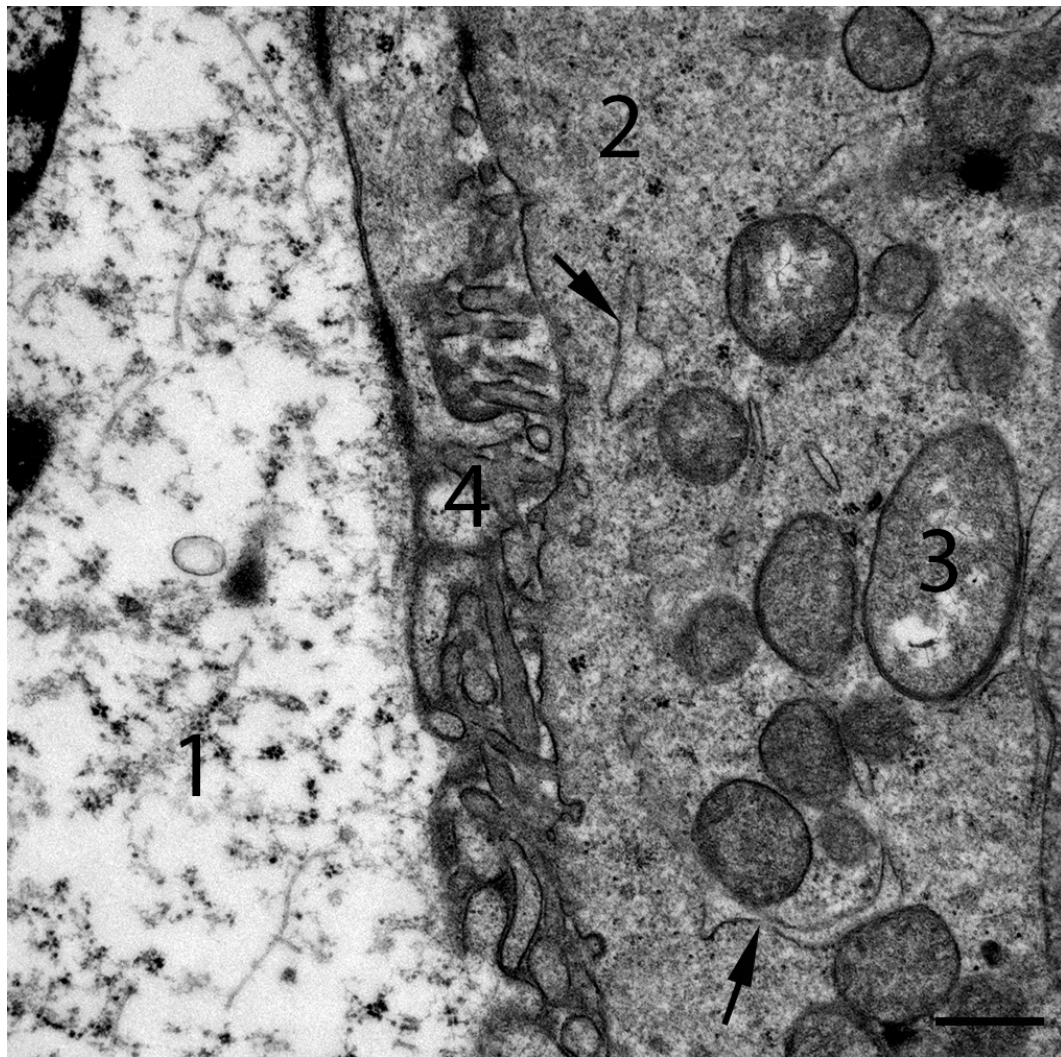


Bild 121: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 118, EM

Zwischen der Granulosazelle (1) und der Oozyte (2) sind deutliche Verzahnungen (4) von Mikrovilli der Oozyte und Projektionen der Granulosazelle zu erkennen. In diesem Bereich wird im Laufe der weiteren Differenzierung des Follikels die Zona pellucida gebildet. Auch im Ooplasma sind noch Fortsätze der Granulosazellen (Pfeile) unter dem Oolemm wahrnehmbar.

1 = Zytoplasma der Granulosazellen, 2 = Ooplasma, 3 = Mitochondrium,
4 = Interdigitationen, Pfeile = Projektionen der Granulosazellen

SB = 500nm

2.2. Ultrastruktur antraler Follikel

Mit Wachstum und Differenzierung der Follikel verändert sich auch die Morphologie, Größe und Zellorganellenverteilung in den Oozyten und Granulosazellen.

Die Zahl der Follikelepithelzellen nimmt im Laufe der Follikelentwicklung immer weiter zu, genau wie deren Größe. Daher sind häufig auch Mitosen in den Granulosazellen zu erkennen. Das Follikelepithel wird iso- bis hochprismatisch und ist durch eine etwa 500nm starke Basalmembran vom umliegenden Ovargewebe abgegrenzt. Das Zytoplasma erscheint homogen und enthält Lipidtropfen mit einem Durchmesser von 400-1000nm, die häufig in kleineren Ansammlungen vorkommen. Daneben sind auch zahlreiche runde Mitochondrien vom Crista Typ zu finden, wie auch einige elongierte Exemplare. Es liegt vorwiegend raues endoplasmatisches Retikulum vor und der Golgi-Apparat ist sehr gut ausgebildet. Die Granulosazellen untereinander zeigen nur noch wenige Interdigitationen und „liningbodies“ und sind häufig über „gapjunctions“ miteinander verbunden.

An die Granulosazellschicht schließt nach außen die Theca interna, die zahlreiche Thekazellen beinhaltet an. Daran folgt die Theca externa, welche sowohl Fibrozyten und Fibroblasten, als auch Gefäße enthält. Die Fibroblasten besitzen einen langgezogenen Zellkern in dem meist ein oder zwei Nukleoli zu erkennen sind. Diese bestehen aus einem äußeren ringförmigen elektronendichten Anteil und einem hellen fibrillären Zentrum. An der inneren Kernlamina ist das Heterochromatin um die zahlreich vorliegenden Kernporen angeordnet. Die prominentesten Zellorganellen sind das gut ausgeprägte raue endoplasmatische Retikulum.

Sobald die Thekazellen sich zu differenzieren beginnen, sind zahlreiche ins Zytoplasma eingelagerte Fettansammlungen zu erkennen. Auch die Anzahl der Mitochondrien vom Crista-Typ nimmt erheblich zu. Der Golgi-Apparat ist gut ausgebildet und befindet sich meist im perinukleären Bereich. Auch Vakuolen und Anteile des rauen endoplasmatischen Retikulums sind zu erkennen.

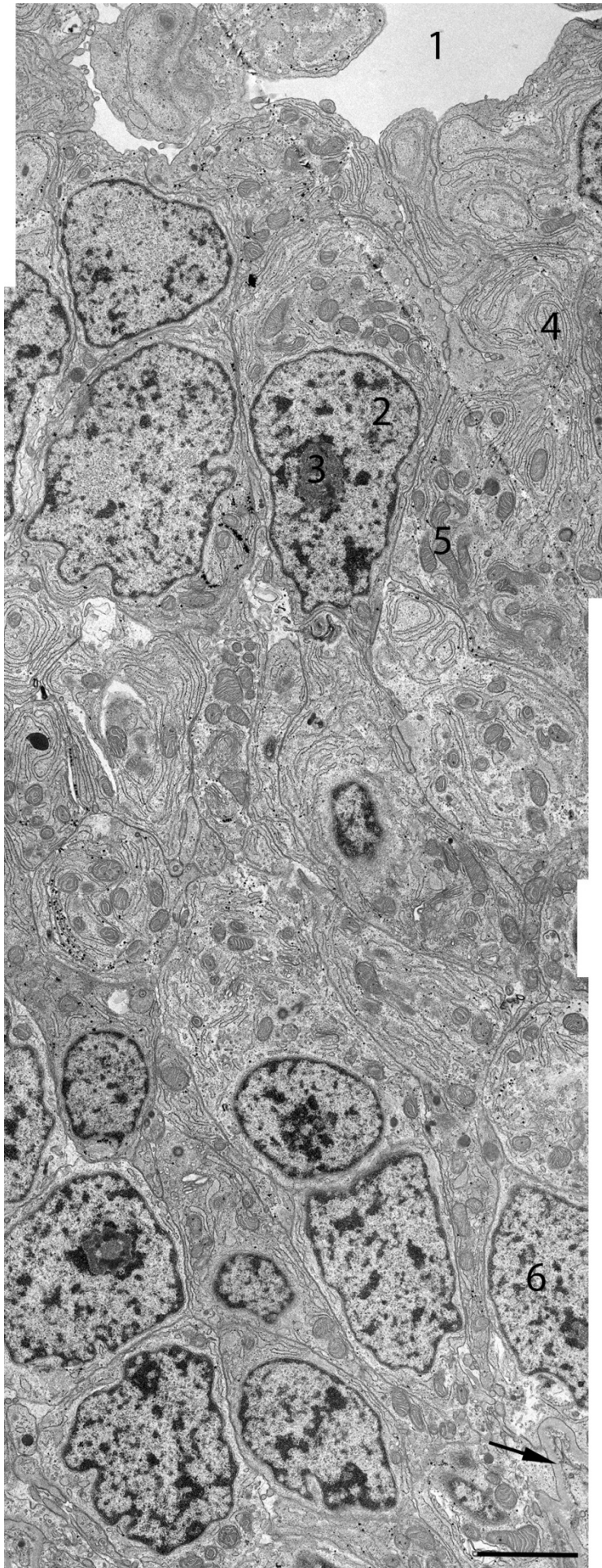


Bild 122: Ovar Katze, Follikelwand eines antralen Follikels, EM

Das mehrschichtige iso- bis hochprismatische Follikelepithel weist regelmäßig geformte Nuklei (2) auf, die manchmal auch einen erkennbaren Nukleolus (3) enthalten. Das endoplasmatische Retikulum (4) ist sehr gut ausgeprägt und die Mitochondrien (5) liegen häufig in Ansammlungen im Zytoplasma vor. Unterhalb der basalen Granulosazellschicht (6) befindet sich die Basalmembran (Pfeil), die den Follikel vom umliegenden Gewebe abgrenzt.

1 = Antrum folliculi,
2 = Nukleus einer Granulosazelle,
3 = Nukleolus,
4 = raues endoplasmatisches Retikulum,
5 = Mitochondrien,
6 = Nukleus einer basalen Granulosazelle,
Pfeil = Basalmembran

SB = 2,5µm

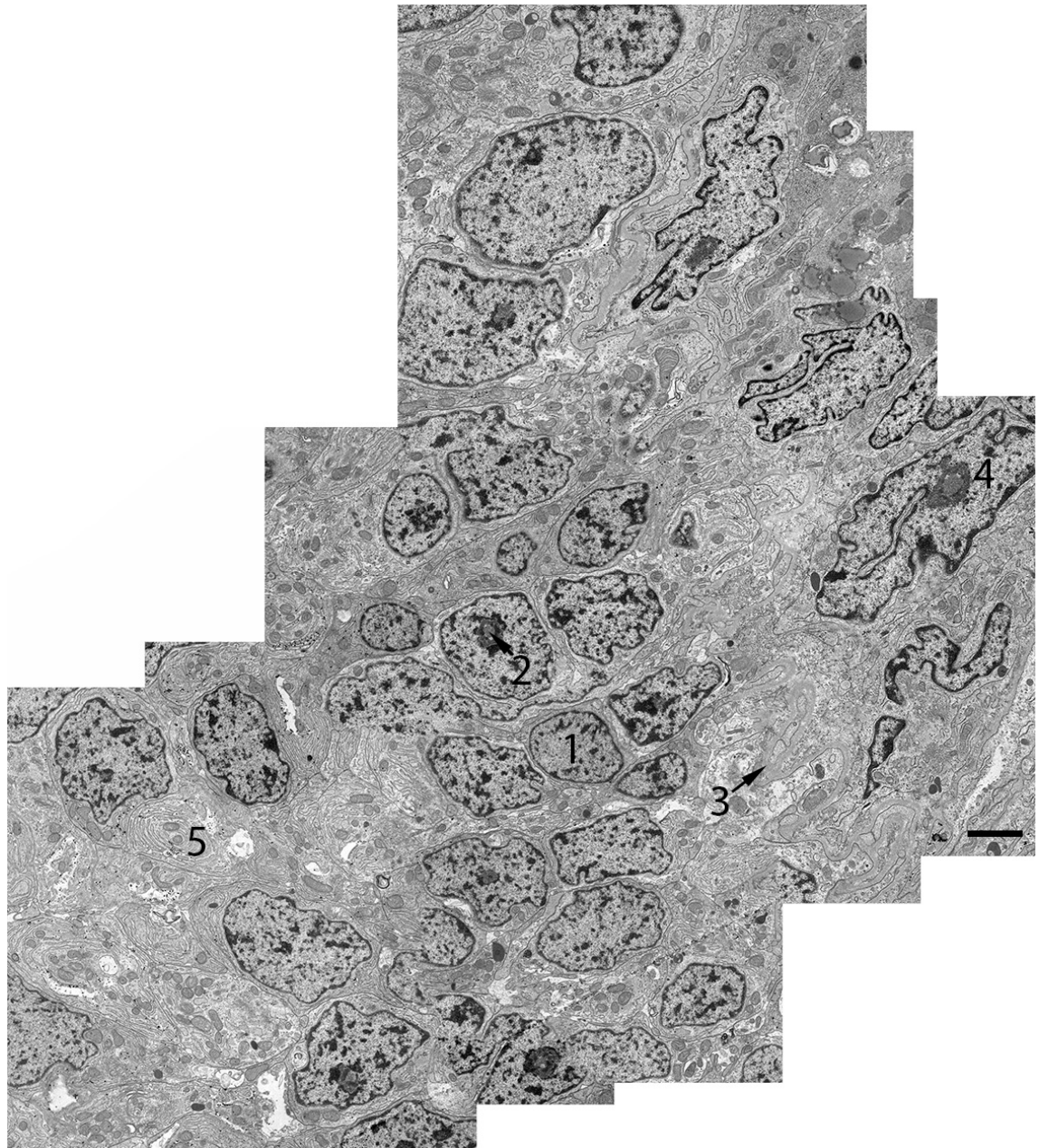


Bild 123: Ovar Katze, Granulosazellschicht eines antralen Follikels, EM

Die Basalmembran (3) grenzt den Follikel von den darunterliegenden Thekazellen (4) ab. In manchen der Granulosazell-Nuklei (1) ist ein prominenter Nukleolus (2) mit hellem fibrillärem Zentrum zu erkennen. In den Granulosazellen, die keinen Anschnitt des Nukleus enthalten ist die radiäre Ausrichtung des rauen endoplasmatischen Retikulums (5) gut zu erkennen.

1 = Nukleus einer Granulosazelle, 2 = Nukleolus, 3 = Basalmembran, 4 = Nukleus einer Thekazelle, 5 = rauen endoplasmatisches Retikulum.

SB = 2,5µm

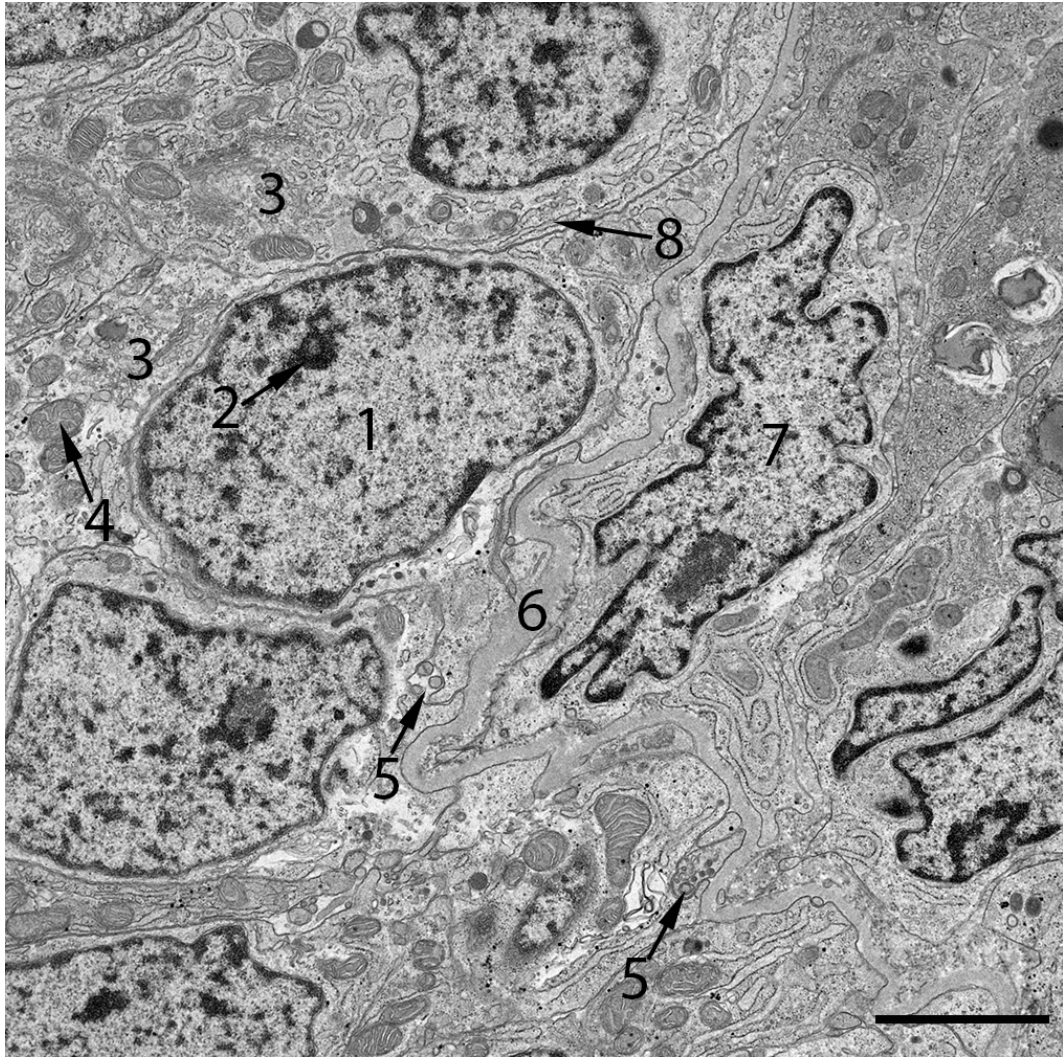


Bild 124: Ovar Katze, Follikelwand, EM

Die Follikelepithelzellen sind durch eine Basalmembran (6) von den darunterliegenden Thekazellen (7) und Fibrozyten abgegrenzt. Die Follikelepithelzellen besitzen einen prominenten meist regelmäßig geformten Nukleus (1) mit häufig erkennbarem Nukleolus (2). Es sind zahlreiche ovale Anschnitte von Mitochondrien vom Crista-Typ (4) zu erkennen. Der Golgi-Apparat (3) ist in den Follikelepithelzellen meist im perinukleären Bereich sehr gut ausgebildet, neben zahlreichen Anschnitten des rauen endoplasmatischen Retikulums (8).

1 = Nukleus einer Granulosazelle, 2 = Nukleolus, 3 = Golgi-Apparat, 4 = Mitochondrium, 5 = Nerv, 6 = Basalmembran, 7 = Nukleus einer Thekazelle, 8 = raues endoplasmatisches Retikulum

SB = 2,5µm

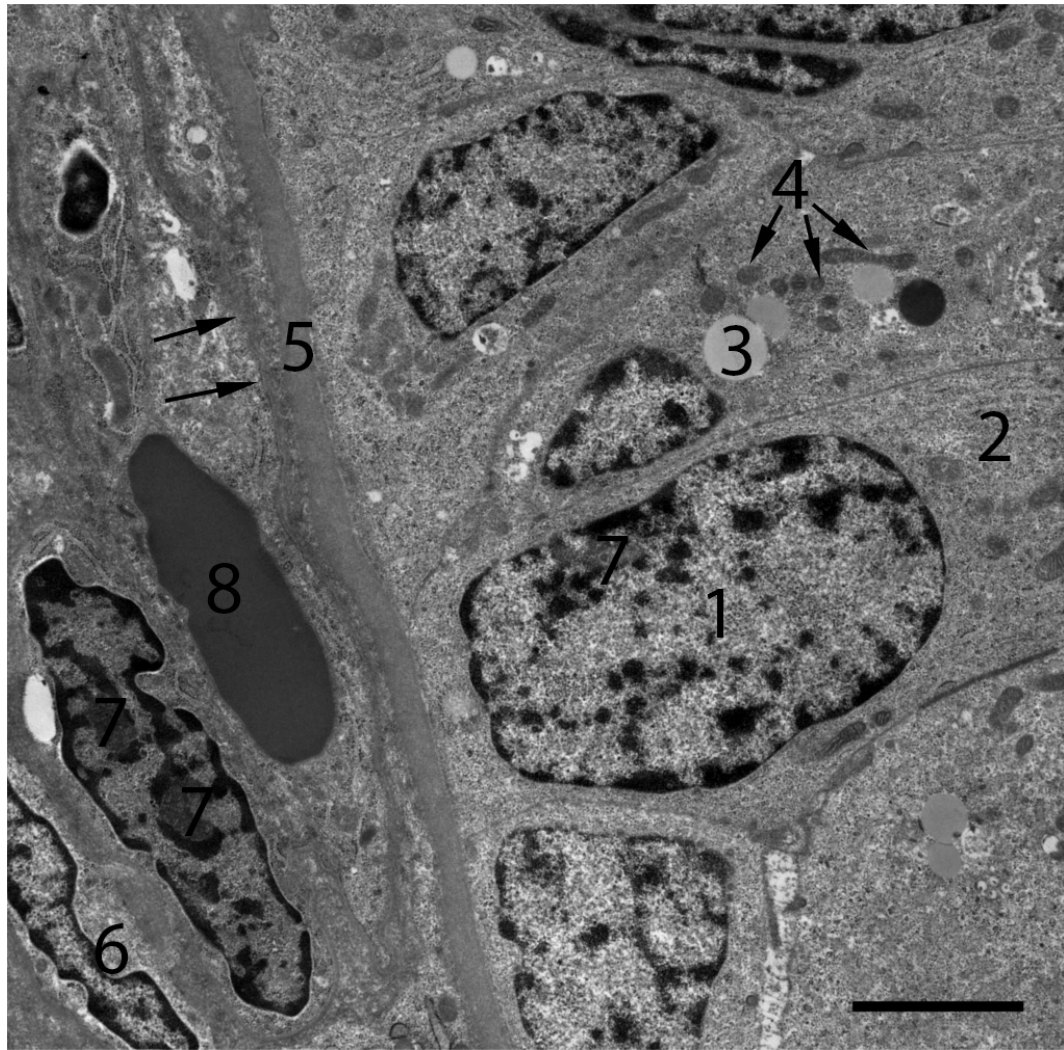


Bild 125: Ovar Katze, Follikelepithel, EM

Entlang der Basalmembran (5) reihen sich mehrschichtig angeordnete iso- bis hochprismatische Follikelepithelzellen (2). Sie enthalten einen großen Nukleus (1) mit einem nicht immer deutlich zu erkennendem Nukleolus (7). Im Zytoplasma dieser Zellen befinden sich vor allem Lipidtropfen (3) und Mitochondrien (4). Im darunterliegenden Ovarstroma befinden sich Fibroblasten (6), mit einem oder zwei Nukleoli (7). Das Heterochromatin ist vorwiegend an der inneren Kernlamina angeordnet und dazwischen sind einzelne Kernporen zu erkennen. Unter der dicken Basalmembran (5) befindet sich ein Blutgefäß mit einer dünnen Basalmembran (Pfeile), in dem ein Erythrozyt (8) enthalten ist.

1 = Nukleus einer Follikelepithelzelle, 2 = Zytoplasma, 3 = Lipidtropfen, 4 = Mitochondrien, 5 = Basalmembran, 6 = Fibroblasten, 7 = Nukleoli, 8 = Erythrozyt, Pfeile = dünne Basalmembran eines Blutgefäßes

SB=2,5µm

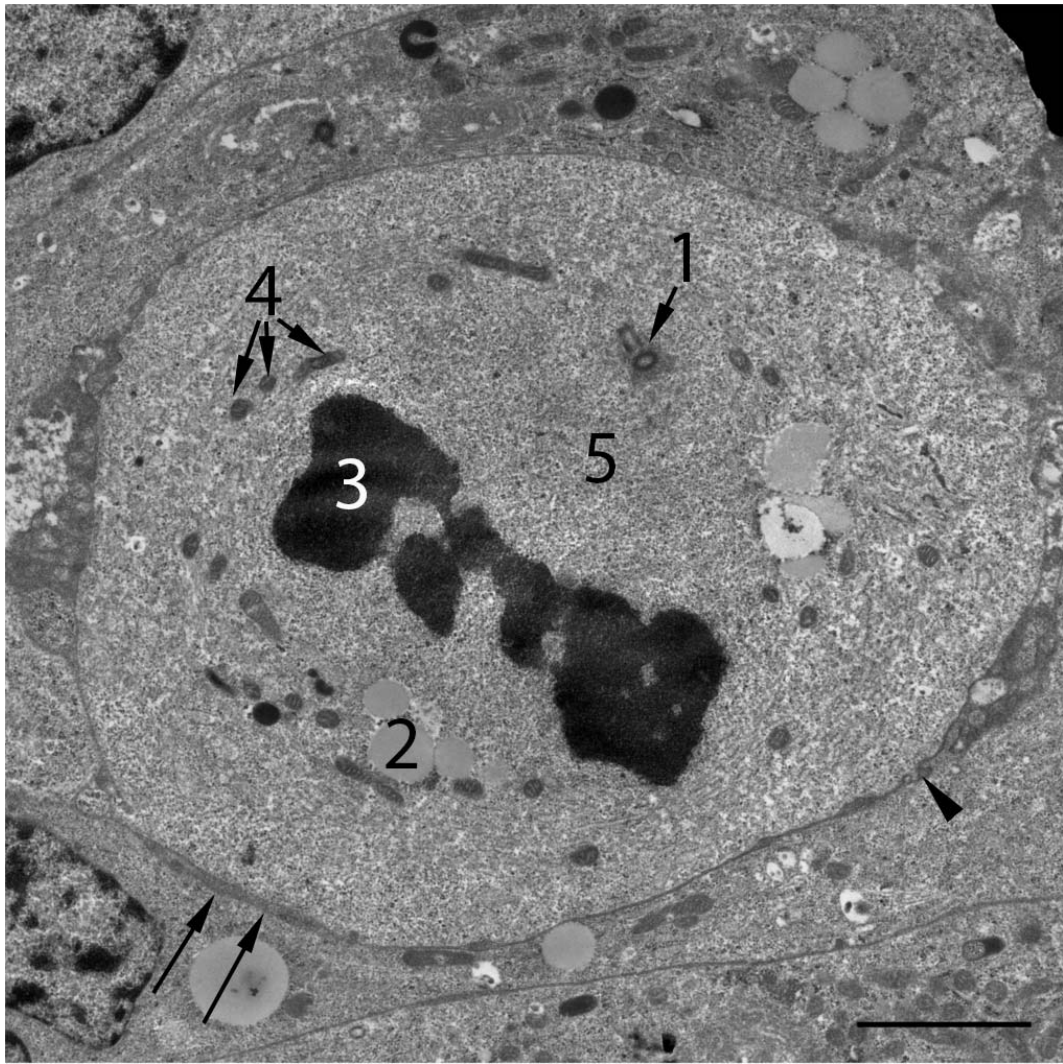


Bild 126: Ovar Katze, Metaphase der Mitose einer Follikelepithelzelle, EM

In der Metaphase der Mitose ist die Kernmembran aufgelöst und das Chromatin liegt kondensiert in Form einer Metaphasenplatte (3) zentral im Zytoplasma (5). Das Zentriol (1) ist deutlich zu erkennen und liegt in Form eines Diplosoms vor. Im Zytoplasma sind vorwiegend Lipidtropfen (2) und Mitochondrien (4) vom Crista-Typ enthalten. An den Zell-Zell-Grenzen sind „gapjunctions“ (Pfeile) und Digitationen (Pfeilspitze) zu finden.

1 = Zentriol, 2 = Lipidtropfen, 3 = kondensierte Chromosomen,
4 = Mitochondrien, 5 = Zytoplasma, Pfeile = „gapjunctions“, Pfeilspitze = Interdigitation

SB=2,5µm

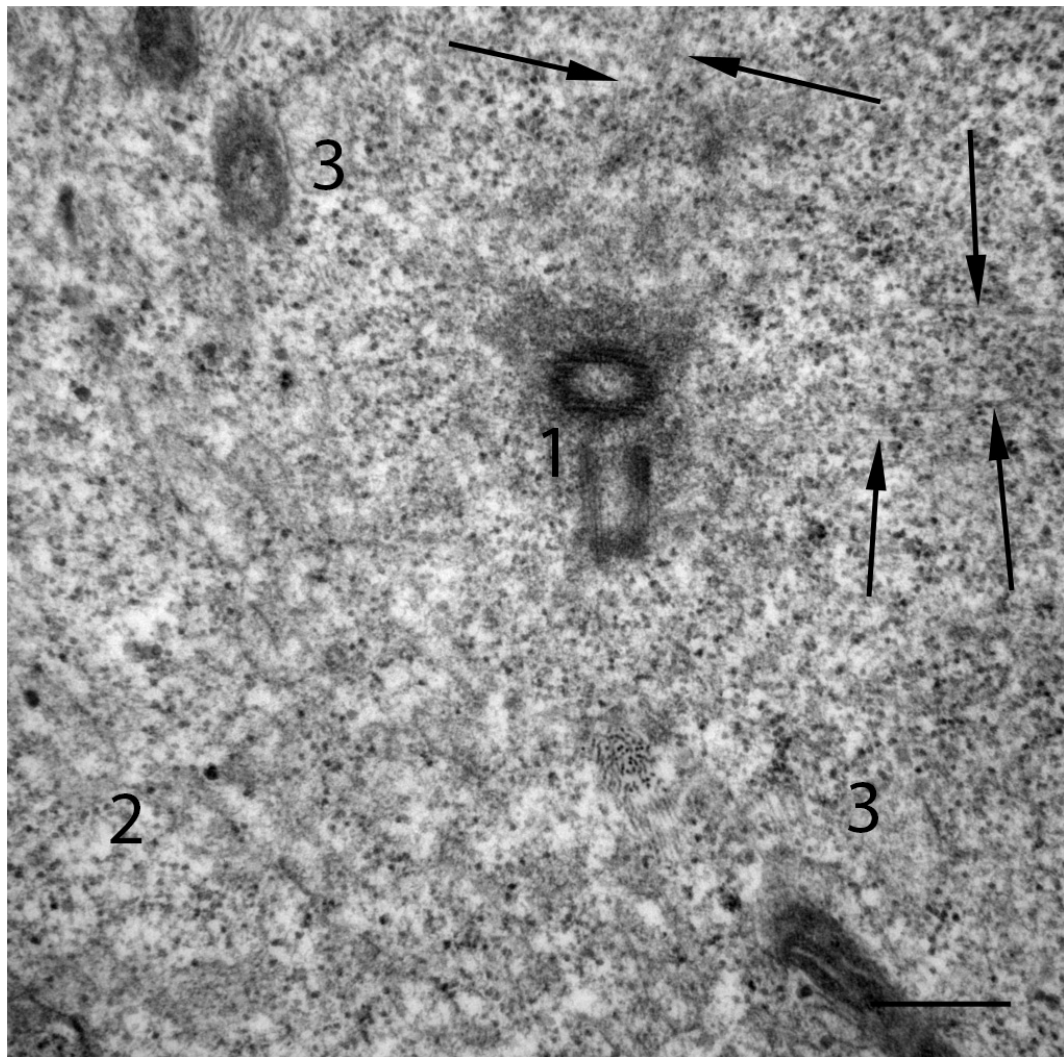


Bild 127: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 117, EM

Vom Zentriol (1) aus ziehen Mikrotubuli durch das Zytoplasma (2). Sie sind sowohl im Längsschnitt (Pfeile), als auch im Querschnitt (3) zu erkennen.

1 = Zentriol, 2 = Zytoplasma, 3 = Mikrotubuli-Querschnitt, Pfeile = Mikrotubuli-Längsschnitt

SB=500nm

2.3. Keimdrüsenepithel

Das Keimdrüsenepithel besteht in den meisten Bereichen aus flachen Epithelzellen, die immer auf einer Basalmembran angeordnet sind. Darunter folgt die bindegewebige Tunica albuginea aus kollagenen Fasern, Fibrozyten und extrazellulären Komponenten. Die Keimdrüsenepithelzellen besitzen meist einen flachen mehr oder weniger verzweigten Nukleus, der sowohl Eu-, als auch Heterochromatin enthält. Letzteres ist vorwiegend in einem schmalen Saum an der inneren Kernlamina angeordnet und durch einige Kernporen unterbrochen. Ein oder zwei Nukleoli sind in manchen Zellkernen zu erkennen. Das Zytoplasma ist wenig elektronendicht, erscheint etwas aufgelockert und enthält vorwiegend runde Mitochondrien vom Crista-Typ sowie einige Vakuolen und raues endoplasmatisches Retikulum. Als Zell-Zell Verbindungen sind unter anderem auch „tightjunctions“ zu erkennen.

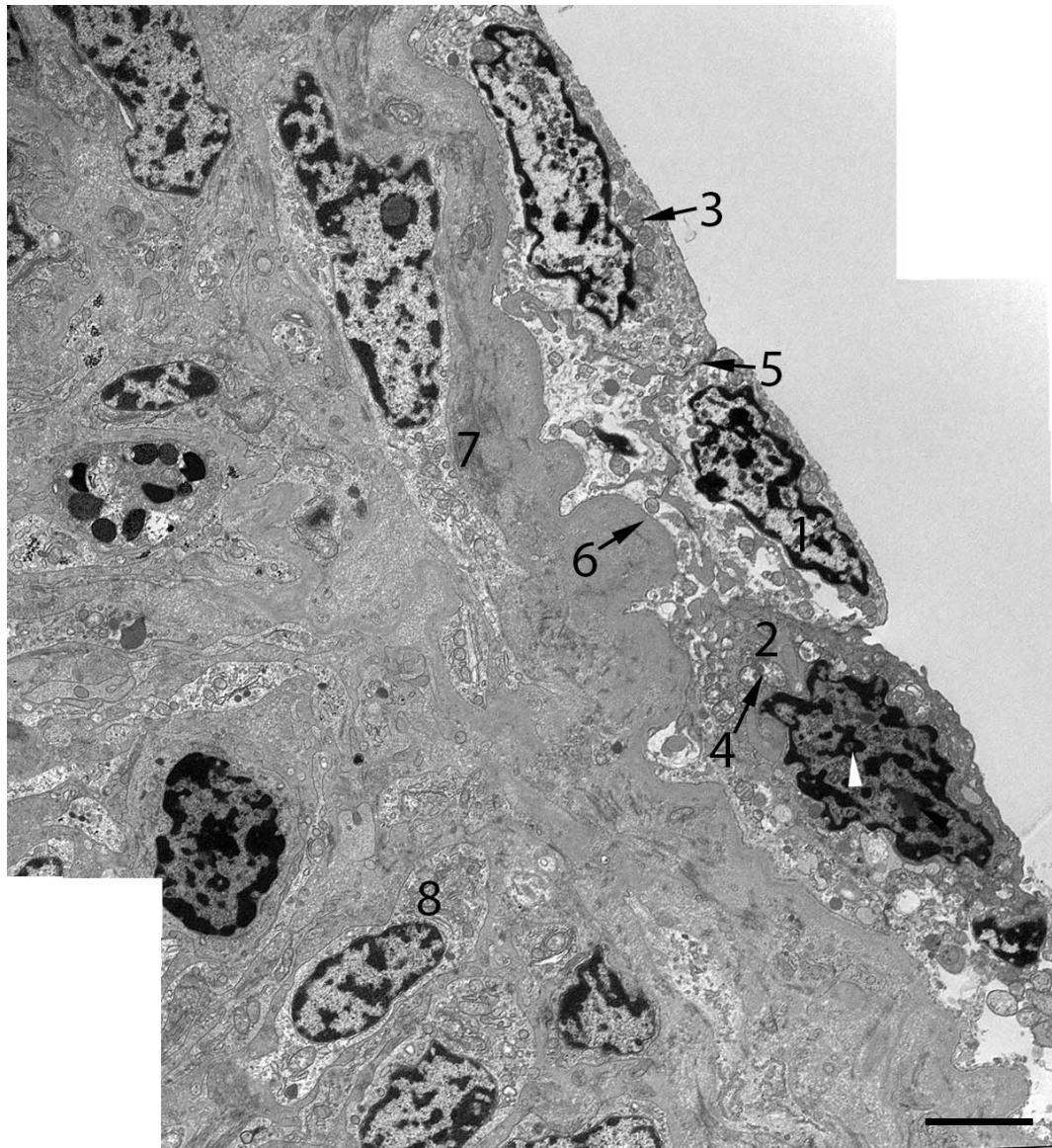


Bild 128: Ovar Katze, Keimdrüsenepithel, EM

Unter dem flachen einschichtigen Keimdrüsenepithel befindet sich die teils in Falten gelegte Basalmembran (6). Der Nukleus (1) der Epithelzellen ist langgezogen und enthält vor allem an der inneren Kernmembran angelagertes Heterochromatin und manchmal ein bis zwei Nukleoli (weiße Pfeilspitze). Das Zytoplasma (2) erscheint aufgelockert und enthält zahlreiche Mitochondrien (3) und Vakuolen (4). Die Keimdrüsenepithelzellen sind untereinander durch „tightjunctions“ (5) verbunden.

1 = Nukleus, 2 = Zytoplasma der Keimdrüsenepithelzelle, 3 = Mitochondrium, 4 = Vakuole, 5 = „tightjunction“, 6 = Basalmembran, 7 = Kollagenfibrillen, 8 = Fibrozyt, weiße Pfeilspitze = Nukleolus

SB = 2,5µm

2.4. Ultrastruktur der Thekadrüsen

Im Ovar der Katze sind häufig Thekadrüsen zu finden. Sie bestehen aus den Thekazellen, die in Verbänden zusammengelagert sind und zentral häufig Bindegewebe und Gefäße oder Reste von Zona pellucida ähnlichem Material enthalten.

Die Thekazellen selbst haben meist eine runde Form und einen häufig auch runden prominenten Nukleus. Dieser enthält vorwiegend Euchromatin und in den meisten Zellkernen ist auch ein elektronendichter Nukleolus von ca. 600-1200nm Durchmesser zu erkennen. Manchmal lässt sich im zentralen Bereich des Nukleolus ein hellerer Bereich erkennen. Die in Drüsenverbänden angeordneten Thekazellen besitzen Ansammlungen von rauem endoplasmatischen Retikulum bei dem häufig eine konzentrische Anordnung zu erkennen ist und zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ, deren Anschnitte sowohl längsoval, als auch elongiert sind. Der Golgi-Apparat ist vorwiegend im perinukleären Bereich gut ausgebildet. Vereinzelt befinden sich auch Lipidtropfen und Lysosomen im Zytoplasma. Diese Zellorganellenverteilung und der heterochromatinarme Zellkern sind für stoffwechselaktive Zellen typisch. An der Zelloberfläche befinden sich häufig Zytoplasmafortsätze, in denen auch Filamente zu erkennen sind.

Sobald die Thekazellen sich zu differenzieren beginnen, sind zahlreiche ins Zytoplasma eingelagerte Fettansammlungen zu erkennen. Auch die Anzahl der Mitochondrien vom Crista-Typ nimmt erheblich zu. Der Golgi-Apparat ist gut ausgebildet und befindet sich meist im perinukleären Bereich. Auch Vakuolen und Anteile des rauhen endoplasmatischen Retikulums sind zu erkennen. Diese Zellorganellen sind für die Steroidhormonsynthese essentiell.

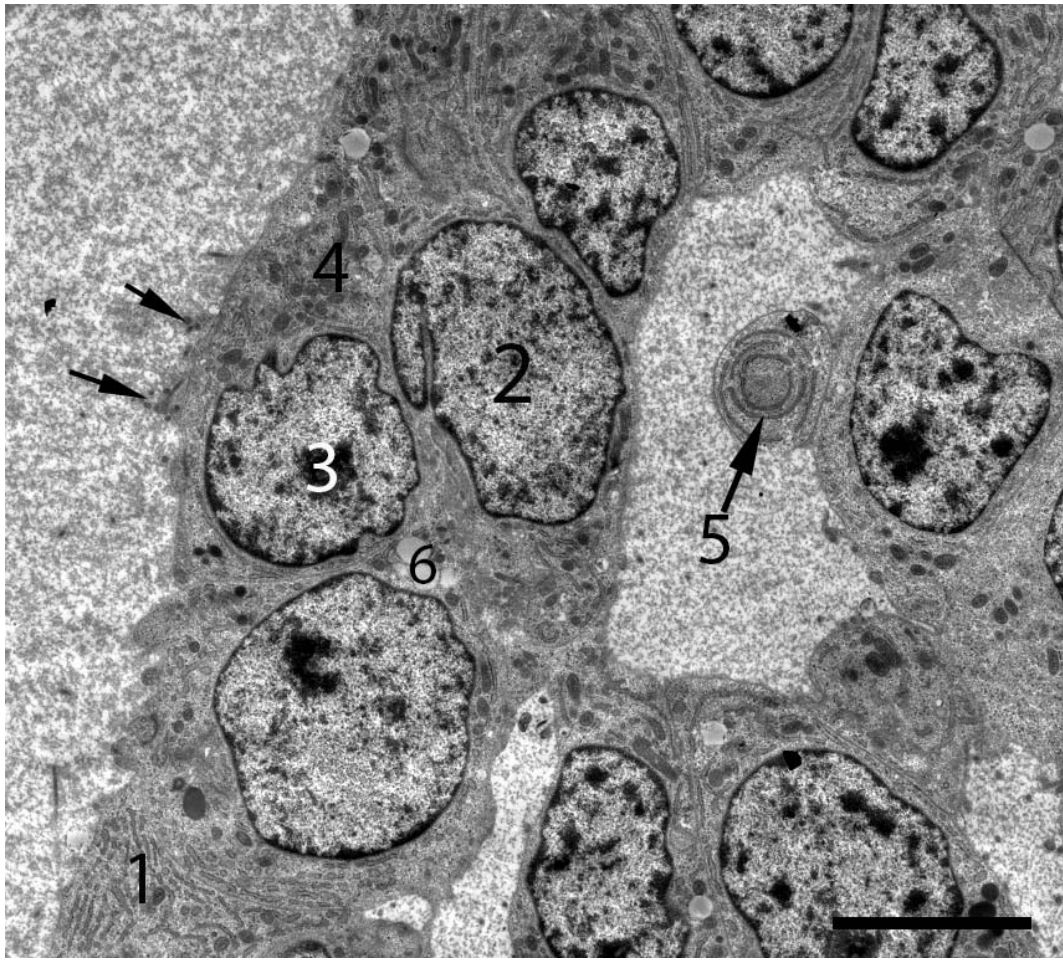


Bild 129: Ovar Katze, Thekadrüse, EM

Die Thekazellen besitzen einen großen Nukleus (2), der euchromatinreich ist und meist einen elektronendichten Nukleolus (3) enthält. Die vorherrschenden Zellorganellen sind Mitochondrien vom Crista-Typ (4) und raues endoplasmatisches Retikulum (1). Daneben finden sich auch Lipidtropfen (6) und vereinzelte Lysosomen.

1 = raues endoplasmatisches Retikulum, 2 = Nukleus, 3 = Nukleolus, 4 = Mitochondrien, 5 = konzentrisch angeordnetes endoplasmatisches Retikulum, 6 = Lipidtropfen, Pfeile = elektronendichte Granula

SB = 5µm

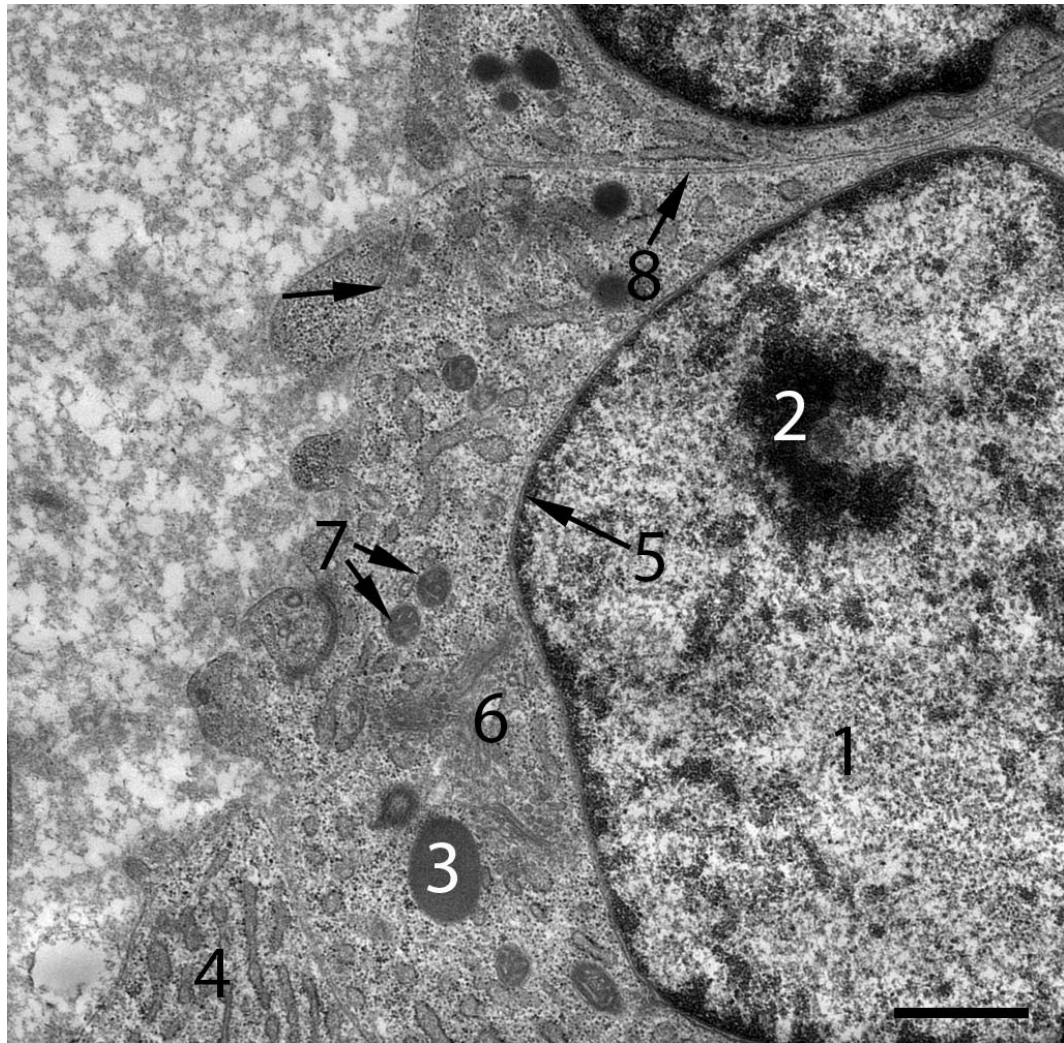


Bild 130: Ovar Katze, Thekadrüsen, EM

Die Thekazellen enthalten einen prominenten heterochromatinarmen Nukleus (1) der häufig einen elektronendichten Nukleolus (2) enthält. Im perinukleären Bereich ist der gut ausgebildete Golgi Apparat (6) zu erkennen. Neben runden Mitochondrien (7) finden sich auch Ansammlungen rauen endoplasmatischen Retikulums (4).

1 = Nukleus mit Euchromatin, 2 = Nukleolus, 3 = Lysosom, 4 = raues endoplasmatisches Retikulum, 5 = Kernlamina, 6 = Golgi Apparat, 7 = Mitochondrien, 8 = Plasmalemn, Pfeile = Filamente im Zytoplasma

SB = 1µm

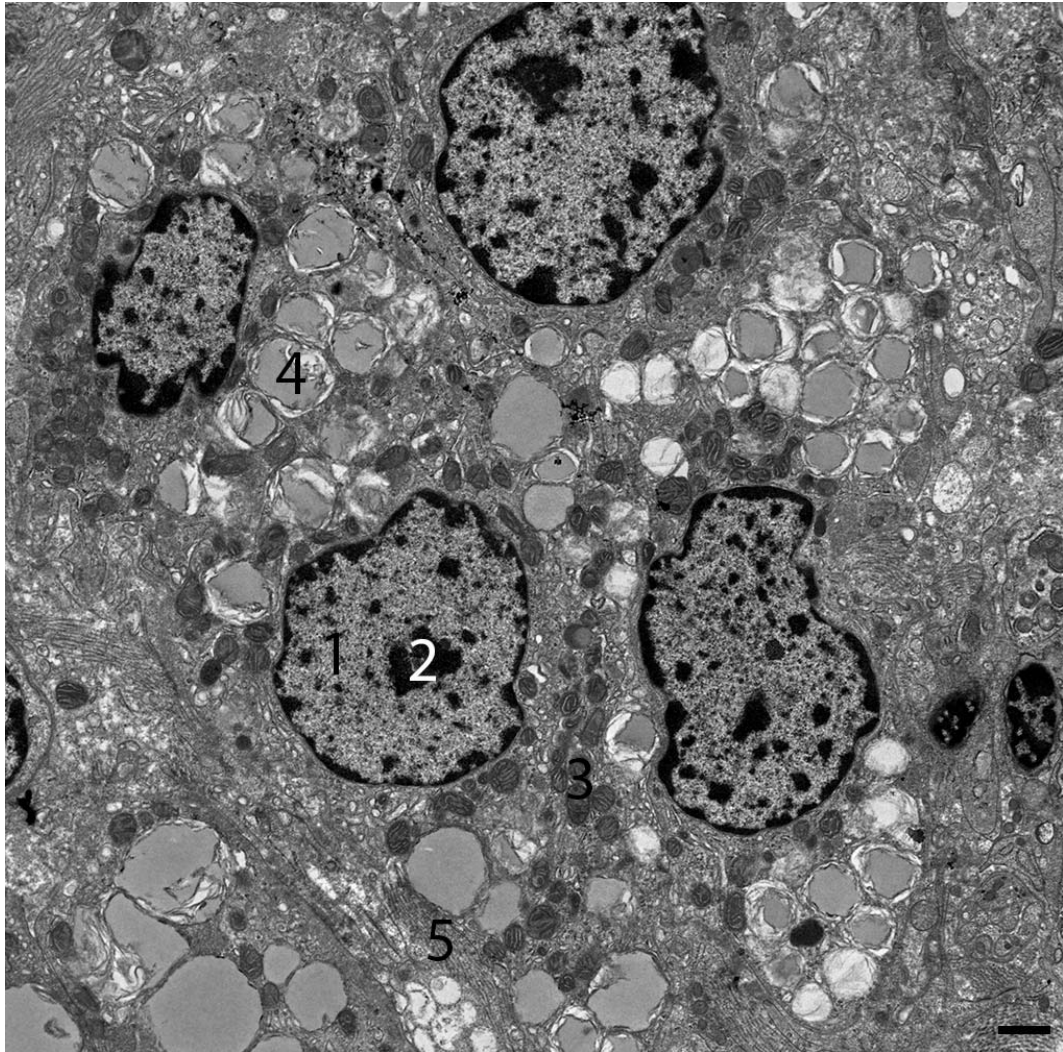


Bild 131: Ovar Katze, differenzierte Thekazellen, EM

In den differenzierten Thekazellen sind neben zahlreichen Mitochondrien (3) viele große Fettropfen (4) im Zytoplasma zu erkennen. Die Zellorganellen im Zytoplasma haben deutlich zugenommen. Nach außen grenzen einige Kollagenfibrillen (5) an die Thekazellen an.

1 = Nukleus, 2 = Nukleolus, 3 = Mitochondrien, 4 = Fettansammlung,
5 = Kollagenfibrillen

SB = 1 μ m

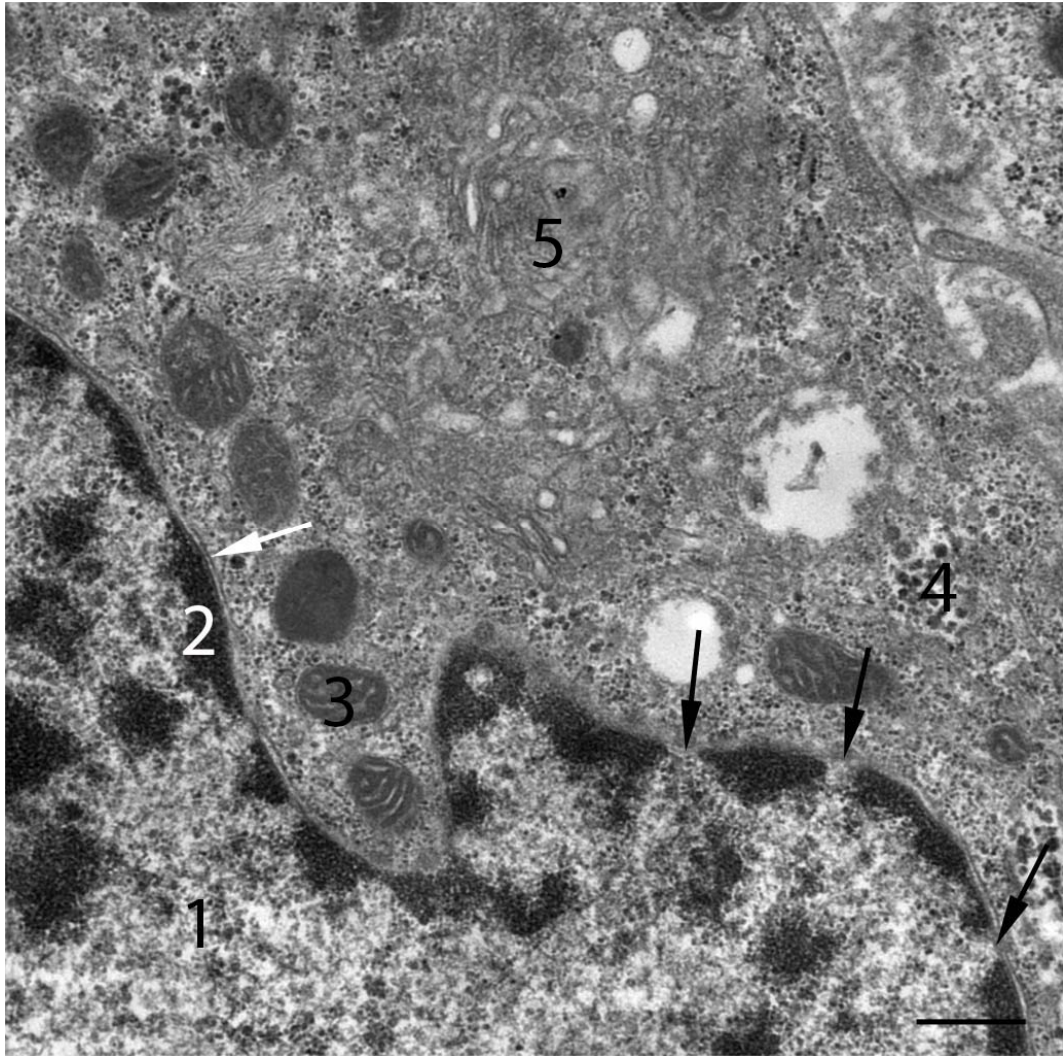


Bild 132: Ovar Katze, perinukleärer Bereich einer Thekazelle, EM

Im Nukleus (1) der differenzierten Thekazelle ist die Verteilung des Heterochromatins (2) entlang der Kernlamina (weißer Pfeil) gut erkennbar. Diese wird durch zahlreiche Kernporen (Pfeile) unterbrochen. Im Zytoplasma sind die Mitochondrien (3) im perinukleären Bereich regelmäßig entlang der Kernmembran aufgereiht. Der Golgi-Apparat (5) ist gut ausgebildet und auch Glykogengranula (4) ist im Zytoplasma zu erkennen.

1 = Nukleus, 2 = Heterochromatin, 3 = Mitochondrium, 4 = Glykogengranula, 5 = Golgi-Apparat, weißer Pfeil = Kernlamina, schwarze Pfeile = Kernporen

SB = 500nm

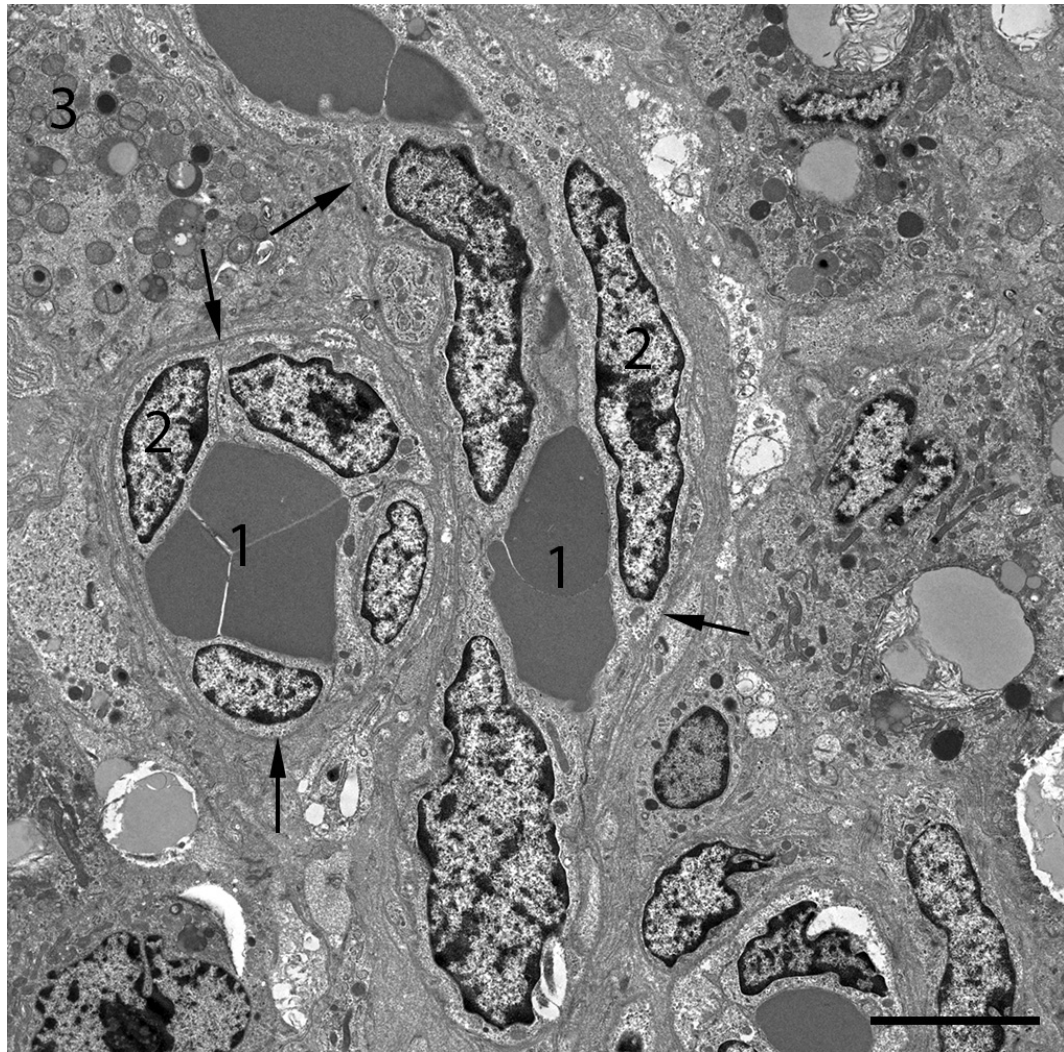


Bild 133: Ovar Katze, Kapillaren im Ovarstroma, EM

Die linke Kapillare ist im Querschnitt getroffen und beinhaltet einen Erythrozyt (1). An die Endothelzellen schließt eine durchgängige dünne Basalmembran (Pfeil) zum umliegenden Gewebe an. Die rechte, im Längsschnitt getroffene Kapillare ist analog aufgebaut und enthält ebenso Erythrozyten (1).

1 = Erythrozyt, 2 = Endothelzelle, 3 = Vesikel und Mitochondrien, Pfeil = Basalmembran

SB = 5µm

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ovarien von 21 weiblichen Katzen lichtmikroskopisch und von vier Katzen elektronenmikroskopisch untersucht. Zur Charakterisierung der verschiedenen Strukturen des feline Ovars wurden verschiedene konventionelle und substrathistochemische Färbungen wie HE, Goldner, van Gieson-Resorcinfuchsin, Alzianblau bei pH 1 und pH 2,5 sowie PAS-Färbung durchgeführt. Daneben wurden die feline Ovarien auch umfangreichen immunhistochemischen und glykohistochemischen Untersuchungen unterzogen.

Das Alter der Katzen lag zwischen sieben Monaten und neun Jahren. Die Ovarien wurden während einer routinemäßigen Ovariectomie in einer tierärztlichen Praxis entnommen. Dabei wurden die kaudal der Nieren gelegenen Eierstöcke mit Hilfe eines Kastrationshakens vorgelagert und sowohl nach kranial, als auch nach kaudal eine Ligatur angelegt.

Die folgende Diskussion bezieht sich auf die unterschiedlichen Funktionsgebilde im Ovar, sowie auf das Keimdrüsenepithel, das Rete ovarii und die Thekadrüsen.

1.1. Primordialfollikel

Die Primordialfollikel sind in großer Anzahl in der Ovarrinde zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei morphologischer Betrachtung der Ovarien ein Rückgang der Follikel festgestellt werden, der sich besonders deutlich durch die Abnahme der Ansammlungen an Primordialfollikeln in der Ovarrinde manifestierte. Dies war vor allem bei den Katzen über fünf Jahre zu erkennen. Meine Untersuchung bestätigt somit die bereits mehrfach beschriebene Abnahme der Ovarreserve (KOHATA et al. 2007).

Bei den glykohistochemischen Untersuchungen konnte eine granuläre Reaktion im Ooplasma bei den Lektinen Con A, WGA, PSA und SNA nachgewiesen werden. Diese spricht für Mannose und/oder Glukose, Sialinsäure und evtl. Glukosamin-haltige und Galaktosamin-haltige Zuckerstrukturen, die im Zytoplasma der Eizellen enthalten sind. Die Basalmembran und Granulosazellen zeigen lediglich eine schwache Reaktion mit Con A und lassen das dortige Vorliegen von Glukose und/oder Mannose vermuten. Dabei reagieren die in der

Basalmembran enthaltenen Glykoproteine, wie z.B. Laminin (TIMPL et al. 1979). Skutelsky hingegen konnte neben Con A auch bei WGA positive Reaktionen in den Granulosazellen nachweisen (SKUTELSKY et al. 1994).

Bei den immunzytochemischen Untersuchungen sind in vereinzelt Follikeln positive Reaktionen mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin (der sowohl mit basischen als auch mit sauren Zytokeratinen reagiert) in den Follikelepithelzellen und der Basalmembran zu erkennen. Auch in einem atretischen Follikel reagierte das degenerierende Follikelepithel stark positiv. Dies führt zu der Annahme, dass einzelne Follikel eine veränderte Struktur des Zytoskeletts aufweisen und eine Bindung mit dem Panzytokeratin-Antikörper stattfinden kann, während bei den meisten Follikeln keine Bindungsstellen vorliegen. Wendl et al. erkannten dieses Phänomen auch in verschiedenen Follikelstadien boviner Ovarien und führten es auf Anpassungsvorgänge des Zytoskeletts in den wachsenden Follikel zurück (WENDL et al. 2012). Die bei meiner Untersuchung reagierenden Primordialfollikel weisen im Vergleich zu den negativen Primordialfollikeln ein kubisches Follikelepithel auf. Also scheinen sie sich nicht mehr im Ruhestadium zu befinden, sondern begonnen haben, sich weiter zum Primärfollikel zu entwickeln. Allerdings war in sämtlichen späteren Follikelstadien keine Reaktion des Follikelepithels zu verzeichnen.

Wie auch in den anderen Follikelstadien lässt sich das Vorkommen von Laminin, als Bestandteil der Basalmembran der Primordialfollikel, durch eine starke immunhistochemische Färbung nachweisen.

Mit dem Synemin-Antikörper konnte eine deutlich positive Reaktion im Ooplasma einiger Primordialfollikel beobachtet und das Vorkommen dieses Intermediärfilaments im Ooplasma nachgewiesen werden. Die Reaktion mit Synemin ist bei den Primordialfollikeln am deutlichsten ausgebildet und nimmt mit zunehmender Follikelgröße wieder ab. Häufig besteht eine Kolo-kalisation von Synemin mit anderen Intermediärfilamenten, wie Vimentin oder Desmin (GRANGER & LAZARIDES 1980). In meiner Untersuchung war nur Vimentin im Ooplasma der Primordialfollikel immunhistochemisch nachweisbar, wobei die Reaktionsstärke deutlich schwächer, als beim Nachweis von Synemin war. Die Reaktion der Granulosazellen beim Nachweis von Synemin verhält sich gegenläufig zur Reaktion mit dem Vimentin-Antikörper. Die Reaktionsstärke beim immunhistochemischen Nachweis von Synemin nimmt mit zunehmender

Follikelgröße zu.

Die Anwendung des S100 Antikörpers ergab lediglich in vereinzelten Oozyten eine schwach positive Reaktion. Im Gegensatz dazu wurden von Mirecka et al. am porcinen Ovar positive Reaktionen der Follikelepithelzellen detektiert und beim Rind zeigte auch das Ooplasma deutlich positive Reaktionen (KAMIYA et al. 1989; MIRECKA et al. 1994). Die Funktionen von S100 sind vielfältig, lassen aber keinen Rückschluss auf die genaue regulatorische Funktion in den Oozyten zu (DONATO et al. 2013). Das Reaktionsmuster im Ovar der Katze unterscheidet sich jedoch deutlich von dem bei anderen Tierarten.

Der Connexin 43-Antikörper zeigt schwache Reaktionen in umgrenzten Bereichen einzelner Granulosazellen, was auf das Vorliegen von „gapjunctions“ hinweist. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie, bei der „gapjunctions“ neben Interdigitationen zwischen den Granulosazellen detektiert wurden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von Resultaten immunhistochemischer Untersuchungen mit dem Connexin 43 Antikörper beim Rind und beim Schwein. Bei diesen konnten im Unterschied zur Katze in den Primordialfollikeln noch keine „gapjunctions“ beobachtet werden (JOHNSON et al. 1999; CHENG et al. 2005). Die „gapjunctions“ werden anscheinend bei der Katze früher ausgebildet als dies bei anderen Tierarten der Fall ist. Die Ergebnisse meiner Untersuchung stimmen aber mit den Resultaten von Korfsmeier und Jewgenow überein, die in ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen bereits im Primordialfollikel der Hauskatze und anderer Feliden „gapjunctions“ und Desmosomen erkannten (KORFSMEIER 1983; JEWGENOW & STOLTE 1996). Somit konnten diese ultrastrukturellen Ergebnisse durch die Anwendung des Connexin 43 Antikörpers bestätigt werden.

Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren wurden bei früheren Untersuchungen des Ovars der Haussäugetiere in den meisten Fällen in den Primordialfollikeln nicht nachgewiesen. Der ER α -Antikörper band jedoch in meinen Untersuchungen bei einigen Primordialfollikeln deutlich an die Zellkerne der Follikelepithelzellen. Diese Beobachtung kann so interpretiert werden, dass einzelne Primordialfollikel aus dem großen Pool ruhender Follikel bereits auf eine östrogene Stimulation reagieren können. Weiter deutet dies darauf hin, dass die Expression von Östrogen-Rezeptoren zyklusabhängig ist und vom Funktionszustand des Ovars abhängt. Die positiven Reaktionen für ER α im Follikelepithel waren

ausschließlich in Ovarien ohne Gelbkörper zu detektieren. Die Corpora lutea sind bei der Katze nur während eines pseudograviden Zykluses oder während der Trächtigkeit aufzufinden, da bei der Katze eine induzierte Ovulation abläuft. Ist kein Gelbkörper vorhanden, steht das Ovar nicht unter Progesteroneinfluss, sondern der Östrogenspiegel steigt im Laufe des Zyklus bis zum Östrus an. Niswender erkannte schon eine Reduktion der Östrogen-Rezeptoren unter Progesteron Einfluss (NISWENDER et al. 2000).

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der Primordialfollikel zeigt im Ooplasma eine große Anzahl an Fettvakuolen, runde Mitochondrien vom Crista-Typ und Vakuolen. Diese Beobachtungen decken sich weitgehend mit früheren Untersuchungen verschiedener Autoren (GURAYA 1979; KORFSMEIER 1983; JEWENGENOW 1996; CARRIJO et al. 2010). Diese beobachteten eher vereinzelte Lipidtropfen, im Gegensatz zu den bei meinen Untersuchungen gefundenen Fettansammlungen. Die „electrodensebodies“ sind in der Oozyte sporadisch entlang des Oolems aufgereiht und wurden in den bisher durchgeführten Untersuchungen nicht erwähnt.

1.2. Primärfollikel

Die Primärfollikel befinden sich im Wachstum. Sie zeigen neben einer Größenzunahme der Oozyte auch eine Vermehrung der Granulosazellen sowie das Auftreten von Mitosefiguren im Follikelepithel. Auch die Verteilung der Zellorganellen in den Granulosazellen ändert sich.

Die glykohistochemischen Untersuchungen der Primärfollikel erbrachten ähnliche Reaktionen wie in den Primordialfollikeln. Die Basalmembran weist ebenso Bindungsstellen für WGA und WGAs auf, welche für das dortige Vorliegen von N-Acetyl-D-Glukosamin und Sialinsäure sprechen. Die granulären Reaktionen sind im Ooplasma bei den Lektinen Con A, WGA und PSA nur noch schwach ausgeprägt, im Vergleich zu den Primordialfollikeln. Im Gegensatz dazu sind in den Granulosazellen stärkere Reaktionen zu verzeichnen. Bei Con A zeigen alle Granulosazellen eine gleichförmige starke Fluoreszenz, wohingegen die Inkubation von SNA zu deutlichen granulären Reaktionen im Zytoplasma einzelner Granulosazellen führt. Schwache Reaktionen waren bei WGA, WGAs und PSA zu verzeichnen. Dieses Bindungsmuster der Lektine spricht für das Vorliegen von Mannose und/oder Glukose, sowie Sialinsäure und/oder N-Acetyl-

D-Galaktosamin und N-Acetyl-D-Glukosamin im Zytoplasma der Granulosazellen. Die Ausstattung mit Glykanen der Primärfollikel dürfte sich somit deutlich von dem der Primordialfollikel unterscheiden. Sutelsky et al. konnten bei ihren glykohistochemischen Untersuchungen in den Granulosazellen neben Con A und WGA auch positive Reaktionen mit RCA erzielen, jedoch WGAs nicht nachweisen (SKUTELSKY et al. 1994). Die Ergebnisse meiner glykohistochemischen Untersuchungen weichen teilweise von den Erkenntnissen anderer Autoren ab, wie auch eine Diskrepanz zwischen den verschiedenen lektinologischen Untersuchungen in der Literatur erkennbar ist. Dies kann durch die unterschiedliche Fixation, Einbettung, Lektinkonzentration, Einwirkzeit und Lektinmarkierung begründet werden. Skutelsky et al. fixierten die Ovarien in Glutaraldehyd und verwendeten deutlich höhere Lektinkonzentrationen (WGA: 50µm/ml, WGAs: 10µm/ml), als in meiner Untersuchung. Die Lektine wurden bei Skutelsky et al. und Parillo & Verini-Supplizi indirekt mit Hilfe der Meerettich-Peroxidase nachgewiesen, wohingegen Bordasch wie in meiner Studie FITC-markiert Lektine verwendete (SKUTELSKY et al. 1994; BORDASCH 1998; PARILLO & VERINI-SUPPLIZI 1999). Roth konnte nachweisen, dass die Art der Fixation, Einbettung und Lektinmarkierung erheblichen Einfluss auf die Intensität der Lektinreaktion hat. So eignet sich Bouin oder Glutaraldehyd fixiertes Gewebe besser zum Lektinnachweis, als Formol fixiertes Gewebe (ROTH 2011).

Das Intermediärfilament Vimentin ist in allen Granulosazellen vorhanden und zeigt durch intensive Bindung des Antikörpers ein dichtes, Netz aus Vimentinfilamenten an. Diese Beobachtung zeigt, dass die Verteilung der vorwiegend in mesenchymalen Zellen vorkommenden Vimentinfilamente in den Granulosazellen der Katze ähnlich wie bei anderen bereits untersuchten Spezies ist (RODLER 2009; MADEKUROZWA 2012; RODLER & SINOWATZ 2013). Allerdings wurden in meiner Untersuchung Vimentinfilamente bereits in den Primordialfollikeln nachgewiesen, wohingegen Wendl et al. in den bovinen Ovarien erst ab dem Stadium des Primärfollikels eine positive Reaktion feststellen konnten (WENDL et al. 2012).

Tubulin lässt sich vor allem im Zytoplasma der einschichtigen isoprismatischen Granulosazellen nachweisen. Die Intensität der Reaktion nimmt mit zunehmendem Wachstum der Follikel zu und ist auch schon in den Primordialfollikeln nachweisbar. Die Primärfollikel befinden sich in der

Wachstumsphase und die Zellteilung läuft unter Ausbildung der Mikrotubuli ab. Des Weiteren sind die Mikrofilamente auch bei verschiedenen intrazellulären Transportvorgängen beteiligt. Auch bei vorhergehenden Untersuchungen verschiedener Autoren bei anderen Tierarten wie z.B. der Eidechse wurde eine starke Reaktionen des Follikelepithels sämtlicher Stadien detektiert (MAURIZII et al. 2004 & 2012).

Der Connexin 43-Antikörper erzielt schwache bis deutlich positive Reaktionen in den Granulosazellen der Follikel. Die starken punktförmigen Reaktionen erscheinen nicht nur entlang der Zellmembran, wo sich die „gapjunctions“ befinden. Es sind auch starke Expressionen im perinukleären Bereich der meisten Zellen zu verzeichnen. Diese könnten Hinweise auf die vermehrte Bildung der Connexine im rauen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat sein (GERHART et al. 2012), die durch die Zunahme der Connexin 43 Produktion im Laufe der Follikulogenese erklärt werden kann. Bei vergleichbaren Studien am Schwein und am Rind wurde lediglich beim Rind eine Expression in den Follikelepithelzellen detektiert (JOHNSON et al. 1999; CHENG et al. 2005). Die „gapjunctions“ in den Granulosazellen scheinen bei der Katze im Vergleich zum Schwein schon früher ausgeprägt zu sein. Im Gegensatz dazu konnte im Ovar der Wachtel Connexin 43 in den Granulosazellen bei sämtlichen Follikelstadien nicht nachgewiesen werden (RODLER 2009).

Die Ergebnisse der ultrastrukturellen Analyse decken sich weitgehend mit den Erkenntnissen verschiedener Autoren, die bereits elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Berücksichtigung der Primärfollikel am Ovar der Katze durchgeführt haben (GURAYA 1979; CARRIJO et al. 2010). Im Unterschied zu vielen anderen Säugetieren ist die beginnende Bildung der Zona pellucida bereits im Primärfollikel zu erkennen (GURAYA 1979; CARRIJO et al. 2010).

1.3. Sekundärfollikel

Die Sekundärfollikel, welche sich durch das Vorhandensein eines mehrschichtigen Follikelepithels auszeichnen, besitzen im Vergleich zu den Primärfollikeln eine deutlich dickere Zona pellucida, die eine Dicke von bis zu 10µm erreicht. Die PAS- und Alzianblaureaktion im Antrum folliculi korreliert mit der bekannten Zusammensetzung des Liquor folliculi, der Hyaluronsäure und Proteine enthält (GURAYA 1979).

Die glykohistochemischen Untersuchungen ergaben bei den Sekundärfollikeln eine starke Reaktion mit den Lektinen Con A, WGA, WGAs, deutliche Reaktionen mit SNA und schwache Reaktionen mit PHAE, PSA und RCA. Die Basalmembran reagierte mit den Lektinen ähnlich wie bei den Primärfollikeln. Neben WGA und WGAs war bei PHAE und Con A auch eine schwache Fluoreszenz zu verzeichnen. Das Ooplasma weist zahlreiche Lektinbindungsstellen für Con A auf, daneben sind schwache granuläre Reaktionen mit PSA zu verzeichnen. Dies weist auf das Vorkommen von Mannose und/oder Glukose hin. Die Granulosazellen reagieren stark mit Con A, deutlich mit WGA und SNA. Schwache Reaktionen sind bei WGAs, PSA, PHAE und RCA zu detektieren. Die zahlreichen Bindungsstellen für die verschiedenen Lektine weisen auf das Vorhandensein vielfältiger Zuckerreste hin, wie Mannose und/oder Glukose, N-Acetyl-D-Glukosamin, N-Acetyl-D-Galaktosamin, N-Acetyl-D-Neuraminsäure und Galaktose. Auch wenn zwei Lektine die gleiche Monosaccharid-Spezifität aufweisen wie Con A und PSA, müssen die Reaktionen nicht gleich ausfallen, da neben dem Zuckerrest (in diesem Fall Mannose oder Glukose) auch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bei der Lektin-Glykan Bindung eine Rolle spielen (ROTH 2011). Die glykohistochemische Untersuchung der Zona pellucida wird in einem eigenen Kapitel diskutiert. Meine Ergebnisse unterscheiden sich in einigen Punkten von dem Lektinbindungsmuster, das Sutelsky et al. bei ihren Untersuchungen der feline Ovarien 1994 erzielt hatten. Dabei wurden in den Granulosazellen und in der Follikelhöhle positive Reaktionen mit Con A, WGA und RCA detektiert, wohingegen WGAs negativ war (SKUTELSKY et al. 1994). In meiner Untersuchung reagierte RCA deutlich schwächer als bei Skutelsky und im Vergleich zu seinen Ergebnissen erzielte ich auch positive Ergebnisse mit WGAs. Dennoch zeigen beide Untersuchungen für andere Lektine eine weitgehende Übereinstimmung. Die Reaktion mit Con A deutet auf das Vorhandensein von Glukose oder Mannoseresten hin, wie auch bei Skutelsky et al.. SNA und WGA lassen das Vorkommen von Sialinsäure vermuten (und evtl. Glukosamin und Galaktosamin). RCA bindet an D-Galaktose und PSA ist wie Con A für Glukose/Mannose spezifisch. Die Intensität der Reaktionen kann sich auch aufgrund unterschiedlicher angewandter Lektinverdünnungen und Fixationsmethoden zwischen verschiedenen Autoren unterscheiden. In meiner Arbeit wurden Schnitte mit Bouin oder Formol fixiert, während Skutelsky et al.

Glutaraldehyd verwendeten. Weiter lagen die Verdünnungen der verwendeten Lektine bei Skutelsky zwischen 10 und 50 µg/ml, während in meiner Untersuchung mit Konzentrationen von 2,5 bis 5 µg/ml gearbeitet wurde. Außerdem beweist eine negative Reaktion nicht das Fehlen eines speziellen Zuckers. Dieser kann auch durch einen anderen Zucker maskiert sein und ist deshalb glykohistochemisch nicht nachweisbar.

Der Laminin-Antikörper reagiert wie in allen Follikelstadien primär mit der den Follikel umgebenden Basalmembran. Daneben wurden auch schwache Reaktionen in den Granulosazellen und sehr schwache Reaktionen im Ooplasma detektiert. Das Ooplasma zeigt nur eine sehr geringe Reaktion direkt unter dem Oolemn, bzw. vom Oolemn selber. In dem Follikelepithel reagiert vorwiegend das Zytoplasma. In vereinzelt Oozyten ist eine schwache Reaktion des Nukleolus zu erkennen, die wahrscheinlich als Artefakt zu interpretieren ist. In der von mir durchgeführten Untersuchung waren primär die den Follikel umgebenden Basalmembranen positiv, wie bereits bei Rind, Schwein, Kaninchen, Maus und Ratte beobachtet (WORDINGER et al. 1983; LEE et al. 1996; VAN WEZEL 1998; BERKHOLTZ et al. 2006; IRVING-RODGERS et al. 2010). Schwache Reaktionen in den Granulosazellen wurden bereits von Bordasch in den Follikelstadien vom Primär- bis zum Tertiärfollikel der Katze beobachtet (BORDASCH 1998). Die Bindung des Laminin-Antikörpers in den Granulosazellen kann ein Hinweis auf enthaltenes Laminin sein, welches zur Bildung der Basalmembran beiträgt und unter anderem aus den Granulosazellen stammt. Im Vergleich dazu zeigte eine Untersuchung an den noch nicht zu Primordialfollikeln formierten Keimzellansammlungen beim Kaninchen und beim Schwein, dass die Basalmembran bereits vor der Follikelformation besteht (LEE et al. 1996). Bei diesen Spezies scheint im Gegensatz zur Katze die Bildung nicht ausschließlich mit den differenzierten Granulosa- oder Stromazellen zusammenzuhängen. Der schwache Nachweis von Laminin im Ooplasma bestätigt ebenso die Ergebnisse von Bordasch, die bei der Katze bereits eine Lokalisation von Laminin in den Eizellen vermutete (BORDASCH 1998). Im Laufe der Differenzierung des umliegenden stromalen Gewebes zu den Thekaschichten beginnen auch einzelne Bindegewebsfasern sowie die in der Theca externa lokalisierten Blutgefäße positiv auf den Laminin-Antikörper zu reagieren.

Der SMA-Nachweis zeigt eine schwache Expression in der Basalmembran, die als Artefakt aufzufassen ist. Um die Primärfollikel sind kaum kontraktile Elemente vorhanden, im Sekundärfollikel nehmen sie bereits zu. Morphologische Untersuchungen zur Verteilung der glatten Muskelfasern im Ovar der Katze und bei anderen Säugetieren zeigten keine glatten Muskelfasern im Bereich der Follikel (BURDEN 1972 & 1973). Erst ab der Differenzierung der Thekaschichten konnten in der Theca externa glatte Muskelzellen nachgewiesen werden.

1.4. Tertiärfollikel

Die Morphologie des Tertiärfollikels zeigt keine Abweichungen von den Ergebnissen anderer Autoren (BURDEN 1972; ALBERTINI et al. 1975; KOHATA et al. 2007).

Die glykohistochemische Untersuchung der Tertiärfollikel erbrachte in den meisten Strukturen ähnliche Ergebnisse wie in den Sekundärfollikel. Deshalb werden nur die Strukturen, die im Sekundärfollikel nicht vorhanden sind, diskutiert. Im Vergleich zu den Granulosazellen weist die Corona radiata eine deutlich stärkere Fluoreszenz mit den FITC-markierten Lektinen WGA, WGAs und SNA auf. In der Corona radiata scheinen im Bezug zu den übrigen Granulosazellen vermehrt Sialinsäure-Reste, N-Acetyl-D-Glukosamin und eventuell auch N-Acetyl-D-Galaktosamin vorzuliegen. Skutelsky et al. konnten keine WGAs-Bindungsstellen in den Follikeln nachweisen. Allerdings waren die Reaktionen mit RCA bei Skutelsky et al. stärker ausgeprägt, als bei meiner Untersuchung, in der nur eine schwache Reaktion der Granulosazellen zu verzeichnen war (SKUTELSKY et al. 1994). Die Theca interna weist Bindungsstellen für Con A, WGA, VAA und PHAE auf, sowie schwache Reaktionen mit WGAs, PSA und SNA auf. Die Theca externa fluoresziert stark nach Inkubation mit WGA-FITC. Schwache Reaktionen sind mit Con A, WGAs, PSA und SNA zu erkennen.

Die Untersuchung mit dem Vimentin-Antikörper zeigt vor allem positive Reaktionen der Granulosazellen. Die unterschiedliche Intensität des Vimentinnachweises im Zytoplasma der Granulosazellen, zugunsten der Zytoplasmaausläufer in Richtung der Zona pellucida, spricht dafür, dass der aus Vimentin bestehende Anteil des Zytoskeletts in diesem Bereich stärker ausgeprägt

ist und möglicherweise seinen Beitrag zur mechanischen Festigkeit dieser Projektionen leistet. In Untersuchungen anderer Autoren konnte bei verschiedenen Säugetieren und bei der Wachtel gleichfalls Vimentin in den Granulosazellen detektiert werden (AKIHARA et al. 2007; MADEKUROZWA 2012; RODLER & SINOWATZ 2011; WENDL et al. 2012). Besonders fällt die Abnahme der Intensität der Reaktion mit dem Vimentin-Antikörper in den Granulosazellen mit fortschreitendem Follikelwachstum auf. Diese Entwicklung wurde auch von anderen Autoren z.B. am Ovar der Wachtel von Rodler und Sinowatz beobachtet und auf die Umorganisation des Zytoskeletts während der Differenzierung zu Steroidhormon-synthetisierenden Zellen zurückgeführt (SHEN et al. 2012; RODLER & SINOWATZ 2013), die auch bei der Katze stattfindet.

Der smooth-muscle-actin-Antikörper (SMA) als Marker für kontraktile Zellen zeigt in den Tertiärfollikeln schwache Reaktionen an der Basalmembran sowie in der Theca interna zwischen den Thekazellen und stärker in der Theca externa und in der Tunica media der dort vorhandenen Gefäße. In einer Studie des Rinderovars wurden ebenso in der Theca externa und in der Tunica media der im Ovar befindlichen Gefäße kontraktile Elemente nachgewiesen. Die Theca interna hingegen zeigte beim Rind keine positive SMA-Reaktion (HIRSCHBERG et al. 2012). Dies kann darin begründet sein, dass die Thekaschichten bei der Katze in manchen Bereichen im Vergleich zum Rind nur undeutlich voneinander abgegrenzt sind. Bei den in den Thekaschichten angefärbten Zellen handelt es sich um Myofibroblasten, die sich im Laufe der Follikelentwicklung differenzieren. Eine funktionell gesehen „kontraktile Follikelkapsel“ wurde von Rodler schon am Ovar der Wachtel beobachtet (RODLER 2009).

Der S100-Antikörper zeigt in den Tertiärfollikeln sehr stark positive Reaktionen in den Thekazellen der Theca interna. Bei Untersuchungen mit dem S100-Antikörper am Ovargewebe anderer Tierarten, wurden nur bei porzinen Ovarien schwache Reaktionen in den Thekazellen detektiert. Daneben waren beim Schwein auch Reaktionen an den Follikelepithelzellen zu erkennen (MIRECKA et al. 1994). Die Reaktionsmuster mit dem S100-Antikörper bei Rind, Ente und Mensch unterschieden sich deutlich von dem der Katze (KAMIYA et al. 1989; SUGIMURA et al. 1989; WOOLNOUGH et al. 2000). Eine starke Reaktion in den Thekazellen ist somit bisher nur bei der Katze zu erkennen, deren immunhistochemisches Reaktionsmuster der Verteilung von S100 sich deutlich

von den Ergebnissen der bei anderen Tierarten durchgeführten Untersuchungen unterscheidet.

Die Reaktion des Connexin 43 Antikörpers in den Granulosazellen entspricht der in den Sekundärfollikeln. In den sehr großen Tertiärfollikeln nimmt die Intensität der Reaktion ab. Das kann darin begründet sein, dass die „gapjunctions“ vor der Ovulation vermindert werden, da sich die Fortsätze der Granulosazellen, welche die Zona pellucida durchqueren, zurückziehen. Dies wurde z.B. schon von Berisha am Ovar des Rindes festgestellt (BERISHA et al. 2009). Des Weiteren ist auch eine starke Reaktion in den Thekazellen der Theca interna zu verzeichnen. Die zytoplasmatische Verteilung des Connexin 43 ist analog zu der in den Follikelepithelzellen. Das Zytoplasma reagiert stark und im Bereich des Golgi-Feldes ist eine starke Immunfärbung zu verzeichnen. In einer Studie zur Verteilung verschiedener Connexine wurde in präovulatorischen Follikeln in den Granulosazellen deutlich mehr Connexin 43 detektiert als in den Thekazellen (BOROWCZYK et al. 2006). In den von mir untersuchten Tertiärfollikeln konnte ich mit der hierbei angewandten immunhistochemischen Methode keinen Unterschied in der Reaktionsstärke zwischen den Granulosa- und Thekazellen feststellen. Vielmehr nahm die Intensität der Reaktion in den Granulosazellen der kurz vor der Ovulation befindlichen Follikel deutlich ab, wohingegen die in den Thekazellen gleich blieb. Die Thekazellen bleiben in ihrer Position während der Ovulation selbst unverändert und wandeln sich im Anschluss zu den Luteinzellen um.

Der Progesteron-Rezeptor-Antikörper zeigt starke bis deutliche Reaktionen in den Kernen der Fibrozyten der Theca externa. Auch in der Theca interna reagieren einzelne Zellkerne der zwischen den Thekazellen gelegenen Fibrozyten. Diese Beobachtung spricht für das Vorhandensein von Progesteron-Rezeptoren in beiden Thekaschichten. Die den Follikel umgebenden Thekaschichten differenzieren sich aus dem spinozellulären Bindegewebe und exprimieren in den Tertiärfollikeln Progesteronrezeptoren in deren Nuklei. In der Literatur werden vor allem Progesteronrezeptoren in den Granulosazellschichten beschrieben (NATRAJ & RICHARDS 1993). Diese konnte ich in meinen Untersuchungen in keinem Follikelstadium nachweisen. Im caninen Ovar konnte eine Expression nukleärer Progesteronrezeptoren im Follikelepithel sämtlicher Follikelstadien mit zunehmender Intensität während des Follikelwachstums beobachtet werden

(VERMEIRSCH 2001). In der gleichen Untersuchung wurden auch moderate Reaktionen in den Thekaschichten detektiert, wie sie auch bei meiner Studie der feline Ovarien zu verzeichnen war (VERMEIRSCH 2001). Diese waren bei den Ovarien ohne Gelbkörper stärker ausgeprägt, also scheinen Progesteronrezeptoren unter Progesteroneinfluss weniger exprimiert zu werden. Bei der Katze sind die Progesteronrezeptoren je nach Zyklusstadium und hormonellen Einflüssen bevorzugt in der Theca externa Schicht lokalisiert. Clemens et al. postulierten bei der Ratte einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten LH-Spiegel und der vermehrten Ausbildung von Progesteronrezeptoren bei der Ratte (CLEMENS et al. 1998). Der LH-Peak wird bei Katzen als induziert ovulierende Spezies nur nach einem entsprechenden vaginalen Stimulus ausgelöst.

1.5. Zona pellucida

Die Zona pellucida ist bei der Katze bereits ab dem Stadium des Primärfollikels licht- und elektronenmikroskopisch zu erkennen, wie schon Carijo festgestellt hat (CARRIJO et al. 2010). Da sie aus Glykoproteinen besteht ist sie besonders deutlich mit der PAS-Reaktion darstellbar. Ab dem Stadium des Sekundärfollikels sind bereits lichtmikroskopisch zwei Schichten zu unterscheiden. Eine innere, kompakt erscheinende dünnere Schicht, die direkt an das Oolemma der Eizelle anschließt, sowie eine äußere lockerer erscheinende dickere Schicht, die sich auch zwischen den Corona radiata Zellen fortsetzt. Die Zona pellucida wurde bereits von anderen Autoren in mindestens zwei verschiedene Schichten eingeteilt (JEWGENOW & RUDOLPH 2001). Die Alzianblau-Färbung zeigt bei pH 2,5 eine deutliche Blaufärbung der Zona pellucida. Bei pH 1 ist nur eine schwache Blaufärbung zu erkennen. Das zeigt das Vorhandensein verschiedener saurer sulfatierter und karboxylierter Mukosubstanzen. Bereits 1989 wurde die Zusammensetzung der Zona pellucida mit substrathistochemischen und glykohistochemischen Methoden von Kimura et al. analysiert (KIMURA et al. 1989), wobei sie gleichfalls eine Schichtung nachweisen konnten.

Da sich die lektinologischen Untersuchungen besonders zur Darstellung der Zuckerstrukturen der Zona pellucida eignen, wurden bereits von verschiedenen Autoren die Bindungsstellen unterschiedlicher Lektine in der Zona pellucida analysiert. Parillo & Verini-Supplizi konnten zeigen, dass bei der Katze die Lektine SBA, PNA, RCA I, GSA I und WGA die deutlichste Reaktion an der ZP anzeigten, was auf das Vorkommen von N-Acetyl-D-Galaktosamin, D-Galaktose

und N-Acetyl-D-Glukosamin Reste schließen lässt. Allerdings erzielte er nur bei WGA eine Reaktion mit der Zona pellucida ohne vorhergehende Desulfatierung, Deacetylierung oder Neuraminsäure Vorbehandlung, da sulfatierte Gruppen in Esterverbindungen die Anfärbbarkeit mit Lektinen verhindern können (PARILLO & VERINI-SUPPLIZI 1999). Von Bordasch wurden mit den Lektinen Con A, GSA II, GSA I, UEA I, ECA, WGA, VAA, DBA, UDA, PNA, MPA, SBA und LTA die Zusammensetzung der Zona pellucida der Katze untersucht. Eine starke Reaktion wurde für Con A, GSA I, WGA, ECA, MPA und SBA beobachtet (BORDASCH 1998). Auch Kimura et al. führten glykohistochemische Untersuchungen an der Zona pellucida der Katze durch. Sie benutzten die Lektine UEA, PNA, MPA, GSA I, SBA, DBA, BPA, GSA II, WGA und Con A verglichen die Lektinbindung der Zona pellucida von Eizellen im Ovar mit jener, von ovulierten Eizellen im Eileiter. Die Eizellen im Follikel reagierten deutlich positiv mit WGA. BPA und GSA II reagierten schwach positiv. Alle anderen Lektine zeigten keine Reaktion mit der Zona pellucida (KIMURA et al. 1989).

In meiner eigenen Arbeit wurden die Lektine Con A, WGA, WGAs, PSA, PHAE, PHAL, VAA, SNA, MAA I, GSL I, RCA und SJA ohne weitere Vorbehandlung, wie Desulfatierung, Deacetylierung oder Neuraminidase-Vorbehandlung durchgeführt. Die stärksten Reaktionen mit der Zona pellucida waren bei WGA zu verzeichnen. Bei WGAs fielen die Reaktionen bereits deutlich schwächer aus. Con A und PSA zeigten eine schwache Bindung, ebenso wie PHAE. SNA zeigt deutliche Reaktionen an der inneren Schicht der Zona pellucida, die der Oozyte zugewandt ist. WGA bindet sowohl N-Acetyl-D-Glukosamin, als auch N-Acetyl-D-Neuraminsäure, deren Konfiguration ähnlich ist. Das Lektin WGAs ist im Gegensatz zu WGA, auf Grund des unterschiedlichen isoelektrischen Punkts, im Gewebe negativ geladen und bindet nicht an Zelloberflächen, die Glykokonjugate mit Sialinsäure-Resten enthalten. Somit ist eine Unterscheidung von Sialinsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin im Gewebe möglich (MONSIGNY et al. 1980). Die Lektine Con A und PSA detektieren die Zuckerstrukturen Glukose und/oder Mannose. SNA-Bindungsstellen in der inneren Schicht der Zona pellucida zeigen das dortige Vorkommen von α -2,6 verknüpften Sialinsäureresten oder terminalen N-Acetyl-Galaktosamin-Resten an. Die Ergebnisse decken sich nur teilweise mit früheren Untersuchungen anderer Autoren. Alle Autoren mit Ausnahme von

Skutelsky et al. konnten zahlreiche WGA-Bindungsstellen an der Zona pellucida feststellen. Die Ergebnisse von Parillo & Verini-Supplizi können nicht direkt mit meinen Resultaten verglichen werden, da sie verschiedene Vorbehandlungen vor der Lektinfärbung einsetzten. Dies war notwendig, da in ihren Untersuchungen ohne Vorbehandlung nur WGA an die Zona pellucida band. Nur drei der von Kimura et al. verwendeten Lektine wurden auch in meiner Arbeit untersucht: Con A, WGA und GSA I. Auch Kimura et al. konnten nur bei WGA starke Reaktionen in der Zona pellucida nachweisen. Bordasch erzielte im Gegensatz zu meinen Untersuchungen neben WGA und Con A auch bei GSA I positive Reaktionen in der Zona pellucida (KIMURA et al. 1989; SKUTELSKY et al. 1994; BORDASCH 1998; PARILLO & VERINI-SUPPLIZI 1999). Bei den Untersuchungen von Skutelsky wurde im Gegensatz zu meiner eigenen Arbeit und den oben genannten Studien nur bei RCA eine Bindung an die innere und äußere Schicht der Zona pellucida erzielt, nicht aber bei WGA (SKUTELSKY et al. 1994). Diese Diskrepanz kann durch Verwendung unterschiedlicher Verfahren zur Fixation, Lektinverdünnung und -markierung erklärt werden. Skutelsky et al. verwendeten Glutaraldehyd zur Fixierung und applizierten die Lektine in der zehnfachen Konzentration, wie sie in meiner Arbeit angewendet wurden. Im Gegensatz zu den bei meiner Untersuchung verwendeten direkt FITC-markierten Lektinen wiesen Skutelsky et al. indirekt durch die Meerettich-Peroxidase nach (SKUTELSKY et al. 1994).

1.6. Atretische Follikel

Follikel jeden Stadiums können atretisch werden und somit eine veränderte Morphologie von Oocyte und/oder Follikel aufweisen. Je nach Follikelstadium sind unterschiedliche Anzeichen für eine Atresie zu erkennen.

Beim Abbau präantraler Follikel mit ausgebildeter Zona pellucida bleibt diese am längsten bestehen und deren eingefaltete Reste sind häufig in der Ovarrinde zu erkennen. Die substrathistochemischen Untersuchungen zeigen ähnliche Ergebnisse wie an der Zona pellucida vitaler Follikel. Lediglich bei SNA ist eine deutlich stärkere Reaktionen zu verzeichnen, was auf einen erhöhten Sialinsäure- oder N-Acetyl-D-Galaktosamin-Gehalt der Zona pellucida von atretischen Follikeln hinweisen kann.

Die atretischen Primordialfollikel, bzw. Übergangsstadien zu den Primärfollikeln

zeigen vereinzelt starke Reaktionen mit dem Panzytokeratin-Antikörper im Follikel epithel. Möglicherweise führt die Atresie der Follikel zu Veränderungen im Zytoskelett der Granulosazellen.

Bei den antralen Follikeln wandern im Verlauf der Atresie Zellen in die Follikelwand ein und obliterieren auch die Follikelhöhle. Zwischen diesen ist z.T. Alzianblau- und PAS-positives Material zu erkennen. Diese sind auch nach Methylierung und Amylasevorbehandlung weiterhin zu erkennen. In der Alzianblaufärbung sind auch bei pH 1 noch Reaktionen zu detektieren. Diese fallen jedoch bei pH 2,5 deutlich stärker aus. Das spricht für Polysaccharide in Form saurer Mukosubstanzen und Glykane, die kein Glykogen enthalten. Wie bereits bekannt ist, wandern vorwiegend Fibroblasten ein und sezernieren Kollagen und verschiedene andere Glykoproteine, welche zum positiven Ausfall der PAS-Reaktion und der Alzianblau-Färbung führen (KAIPIA & HSUEH 1997; RODGERS & IRVING-RODGERS 2010; WANG et al. 2010). Das Glykosilierungsmuster der atretischen antralen Follikel verhält sich ähnlich wie in den Sekundär- und Tertiärfollikeln. Zum Teil sind eingewanderte Makrophagen zu erkennen, die eine sehr deutliche Bindung der Lektine Con A, WGA, WGAs und SNA aufweisen.

Bei Vimentin fällt die Reaktion in den Granulosazellen atretischer Follikel deutlich schwächer aus, was für einen durch die Atresie verursachten Abbau einzelner Zytoskelettanteile spricht. Weiter wandern auch Vimentin-positive Zellen, also aus dem umgebenden Stroma, in die verbliebene Follikelhöhle und Follikelwand ein.

Der Laminin-Nachweis fällt in den atretischen antralen Follikeln schwächer aus als in den vitalen Follikeln gleicher Größe. Dies kann durch den beginnenden Abbau der den Follikel umgebenden Basalmembran verursacht sein.

Die Wand atretischer Follikel wird deutlich von SMA-positiven, also kontraktile Zellen infiltriert. Auch die in der Follikelwand gebildeten Gefäße sind teilweise SMA positiv. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass im weiteren Verlauf der Atresie kontraktile Zellen (wahrscheinlich Myofibroblasten) am Umbau bzw. Abbau beteiligt sind.

In den Granulosazellen ist ein starker Rückgang der Expression von Connexin 43 zu verzeichnen. Diese Beobachtung wurde bereits von Cheng et al. an den

Granulosazellen porziner Follikel gemacht (CHENG et al. 2005). Dies kann durch den Abbau von „gapjunctions“ in atretischen Follikeln begründet werden. Die positiven Reaktionen in den Theca interna Zellen sind weitgehend unverändert, was darauf hinweist, dass deren „gapjunction“ im Vergleich zu den Granulosazellen nicht abgebaut werden. Es ist eine Korrelation mit den morphologischen Beobachtungen der Follikel im Verlaufe der Atresie festzustellen, da die Zahl der Thekazellen um die Follikelreste eher zu, als abnimmt und der Zellverband nicht aufgelöst wird.

1.7. Gelbkörper

Die Gelbkörper, die nur in einem Teil der untersuchten Ovarien zu finden waren, konnten in ihrem „Blütestadium“ aufgrund ihrer Größe bereits makroskopisch erkannt werden. Histologisch bestehen sie aus den Granulosaluteinzellen, die einen großen, häufig durch Fetttröpfchen vakuolisiert erscheinenden Zytoplasmaanteil aufweisen und den deutlich kleineren und in geringerer Anzahl vorkommenden Thekaluteinzellen. Daneben sind auch Fibrozyten und Gefäße enthalten und eine vorwiegend kollagene bindegewebige Kapsel grenzt den Gelbkörper zum umliegenden Gewebe ab. In den Thekaluteinzellen sowie in den Fibrozyten befinden sich PAS-positive Substanzen, die durch Amylasevorbehandlung deutlich abgeschwächt werden, also auch Glykogen enthalten.

Die glykohistochemischen Untersuchungen zeigen in den Granulosaluteinzellen eine starke Bindung von Con A und schwache Reaktionen mit PSA, welche an dort vorliegende Glukose und/oder Mannose-Reste binden. Die starke Fluoreszenz bei SNA sowie die deutliche Reaktion bei VAA und die schwache Anfärbung mit WGA bei fehlender Reaktion mit WGAs lassen auf das Vorkommen von Sialinsäure und evtl. Galaktose bzw. N-Acetyl-D-Galaktosamin schließen. Mit den Lektinen RCA und PHAE sind nur sehr schwache Reaktionen zu erkennen. Die RCA-Bindungsstellen lassen auf das Vorkommen Galaktosehaltiger Reste schließen. Die Thekaluteinzellen weisen ein ähnliches Glykosilierungsmuster wie die zwischen den Luteinzellen gelegenen Fibrozyten auf. Beide zeigen positive Reaktionen mit Con A und PSA, die an Glukose und/oder Mannose binden. Die Fluoreszenz ist bei den Thekaluteinzellen deutlich stärker. Beide reagieren schwach mit WGA, WGAs und SNA, was für das Vorliegen von N-Acetyl-D-Glukosamin, Sialinsäure und evtl. N-Acetyl-D-

Galaktosamin spricht. Nur in den Fibrozyten ist eine undeutliche Reaktion mit dem PHAE-Lektin zu erkennen. Die im Gelbkörper enthaltenen Gefäße zeigen nach Inkubation mit PSA eine stark positive Reaktion, was das Vorhandensein von Glukose und/oder Mannose anzeigt.

Nach Inkubation mit dem Vimentin-Antikörper ist eine stark positive Reaktion im Zytoplasma der Granulosaluteinzellen zu beobachten. Die Thekaluteinzellen hingegen sind negativ und in den Fibrozyten sind nur in manchen Bereichen schwache Reaktionen wahrnehmbar. Das Endothel der im Corpus luteum enthaltenen Gefäße zeigt eine deutliche Anfärbung. Im Ovar der Ratte wurde ebenfalls Vimentin im Corpus luteum nachgewiesen, allerdings unterschieden die Autoren nicht, welche Zellarten im besonderen reagierten (NILSON et al. 1995). Die starke immunhistochemische Färbung der Granulosaluteinzellen, die auch deutlich stärker als in den Granulosazellen der Tertiärfollikel ausfällt, beweist eine deutliche Umwandlung des Zytoskeletts zu Steroidhormon-synthetisierenden Zellen während der Luteinisierung.

Der Nachweis von Tubulin im Corpus luteum zeigt in den Granulosaluteinzellen eine deutliche, homogene Anfärbung des Zytoplasmas. Die Thekaluteinzellen reagieren deutlich schwächer und zeigen eher punktförmige Reaktionen im perinukleären Bereich. In den großen Gefäßen sind auch positive Reaktionen zu detektieren, wohingegen in den kleineren Gefäßen oft kein Nachweis des Tubulin-Antikörpers erbracht werden konnte. Sowohl Vimentin, als auch Tubulin sind in Steroidhormon-synthetisierenden Zellen wichtig für den intrazellulären Transport der Substrate und synthetisierter Steroide (SHEN et al. 2012).

Auch das S100 Protein konnte im Zytoplasma der Granulosaluteinzellen nachgewiesen werden. Das Reaktionsmuster zeigt ausschließlich eine zytoplasmatische Lokalisation, die sich in ihrer Intensität unterscheidet. Vereinzelte Granulosaluteinzellen reagierten deutlich stärker als ihre benachbarten Zellen. Dies könnte z.B. durch die unterschiedliche Entwicklung oder Syntheseleistung der einzelnen Zellen zustandekommen. Auch in den Thekaluteinzellen waren Reaktionen mit dem S100 Antikörper zu erkennen, die deutlich schwächer als bei den größeren Granulosaluteinzellen ausfallen. Das Bindegewebe zeigt nur im Bereich der den Gelbkörper umschließenden Kapsel nennenswerte Reaktionen. Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen stellten Mirecka et al. bei der Untersuchung porziner Corpora lutea lediglich schwache Reaktionen

in jungen Thekaluteinzellen fest, wohingegen die Granulosaluteinzellen negativ waren (MIRECKA et al. 1994). Die Verteilung von S100 in den felines Corpora lutea unterscheidet sich deutlich von der anderer Tierarten.

Mit dem Connexin 43-Antikörper zeigen die Granulosaluteinzellen ein typisches immunhistochemisches Anfärbungsmuster. Im Zytoplasma ist nur eine sehr schwache Reaktion zu erkennen, wohingegen die Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Granulosaluteinzellen fokal punktförmige, intensiv angefärbte Areale entlang der Zellmembran zeigen. Dieses Verteilungsmuster verdeutlicht die Lokalisation von Connexin 43 in den „gapjunctions“ zwischen den einzelnen Granulosaluteinzellen. Diese scheinen dort sehr ausgeprägt zu sein und ermöglichen den Austausch kleiner Moleküle. In einer Studie am Gelbkörper des Schweines wurde bereits festgestellt, dass „gapjunctions“ essentiell für die Funktion Steroidhormon-synthetisierender Zellen sind und in den Granulosaluteinzellen je nach Differenzierungsgrad des Gelbkörpers unterschiedlich ausgebildet sind (BOROWCZYK et al. 2006 & 2007). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Borowczyk et al. war in meiner Untersuchung die Reaktion der Thekaluteinzellen deutlich schwächer ausgeprägt.

Der Antikörper gegen den Progesteron-Rezeptor zeigt eine positive Reaktion in den Zellkernen einiger Fibrozyten und Fibroblasten, die zwischen den Granulosaluteinzellen gelegen sind. Auch einige Thekaluteinzellen zeigen eine Anfärbung ihres Nukleus, wohingegen in den Granulosaluteinzellen keine Reaktion erkennbar ist. In Studien zur Verteilung der Progesteron-Rezeptoren im Corpus luteum des Menschen wurden sowohl in beiden Luteinzelltypen, als auch in den Fibroblasten positive Ergebnisse verzeichnet (MAYBIN & DUNCAN 2004). Auch im caninen Ovar sind schwache Reaktionen in den Luteinzellen zu beobachten (VERMEIRSCH 2001). Ist ein Gelbkörper auf dem Ovar vorhanden, liegt eine Pseudogravidität vor (da keines der untersuchten Tiere trächtig war) und das Ovar steht vor allem unter Progesteron-Einfluss. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an der Hündin und der Frau weisen die Granulosaluteinzellen der Katze keine Progesteron-Rezeptoren auf (VERMEIRSCH 2001; MAYBIN & DUNCAN 2004).

Immunhistochemisch unterscheiden sich die Granulosaluteinzellen deutlich von den Thekaluteinzellen. Bei ersteren fallen die Reaktionen mit den Vimentin, Tubulin, S100 und Connexin 43 Antikörpern deutlich stärker aus. Im Gegensatz

dazu fällt der Nachweis von Progesteron-Rezeptoren in den Granulosaluteinzellen negativ aus während die Thekaluteinzellen kernständige Progesteron-Rezeptoren aufweisen.

1.8. Rete ovarii

Das Rete ovarii war nur in einigen der untersuchten Ovarien zu finden. Das ein- bis mehrschichtige iso- bis hochprismatische Epithel enthält mit zunehmender Höhe deutlich PAS-positive Glykokalix, die auch nach Amylasevorbehandlung und Methylierung weiterhin erkennbar bleiben. Gelberg et al. konnten bereits bei ihren Untersuchungen PAS-positive Substanzen im konnektiven und extraovariellen Rete nachweisen (GELBERG et al. 1984). Vor allem die im Lumen des tubulären Netzwerks befindlichen PAS-positiven Substanzen weisen auf sekretorische Funktionen des Rete ovarii hin.

Die glykohistochemischen Untersuchungen mittels Lektinen zeigen eine starke Bindung des FITC-markierten Con A. Dieses bindet an Glukose und/oder Mannose, die somit in den epithelartigen Zellen vorliegen. Auch SNA zeigt deutliche Reaktionen mit vereinzelt Zellen, wohingegen andere negativ sind. Das Lektin SNA zeigt das Vorhandensein von α 2,6-Sialinsäure oder N-Acetyl-D-Galaktosamin auf, das allerdings nur in einzelnen Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die immunhistochemischen Nachweise zeigen sehr starke Reaktionen mit dem Panzytokeratin-Antikörper, der auf das Vorhandensein zahlreicher Zytokeratin-Intermediärfilamente hinweist. Die bereits bei anderen Tierarten und auch bei der Katze durchgeführten Untersuchungen erbrachten bei Katze, Hund, Wachtel und Rind ebenso positive Nachweise von Zytokeratinen im Rete ovarii (ESPINOSA DE LOS MONTEROS et al. 1999; AKIHARA et al. 2007; RODLER & SINOWATZ 2011; WENDL et al. 2012).

Der Tubulin-Antikörper zeigt im Zytoplasma der Rete-Epithel-Zellen eine deutliche bis starke Reaktion. Diese nimmt mit Höhe des Epithels zu; also vom intraovariellen über das konnektive zum extraovariellen Rete verstärkt sich die Reaktion. Diese sind vor allem auf der luminalen Seite der Epithelzellen und in dem ziliären Besatz lokalisiert. Dieses Verteilungsmuster spricht möglicherweise für die Bedeutung von Tubulin in Form der Mikrotubuli für die sekretorischen Funktionen des Rete ovarii, die mit zunehmender Epithelhöhe steigen. Die

sekretorischen Eigenschaften des Rete ovarii wurden bereits 1975 von Byskov beschrieben (BYSKOV 1975).

In einzelnen Zellen des Rete ovarii sind nukleäre Progesteron-Rezeptoren nachweisbar. Sie liegen in der Regel zwischen vielen negativen Rete-Epithelzellen. Vermeirsch konnte bei der Untersuchung caniner Ovarien keinen Nachweis von Progesteron-Rezeptoren im Rete ovarii erzielen (VERMEIRSCH 2001). Im humanen Rete ovarii hingegen konnte die Expression von Progesteron-Rezeptoren abhängig vom Zyklusstand beobachtet werden (KHAN et al. 1999). Auch bei meiner Studie waren Progesteron-Rezeptoren nachweisbar, allerdings in unterschiedlicher Konzentration in den einzelnen Zellen. Dies ist damit zu erklären, dass feline Ovarien verschiedener Funktionszustände studiert wurden, die unter Einfluß eines unterschiedlichen Hormonprofils standen.

Die Östrogen-Rezeptoren konnten mit Hilfe immunhistochemischer Methoden in vielen Rete-Epithelzellen nachgewiesen werden. Die Inkubation der Schnitte mit dem ER α -Antikörper führte in zahlreichen Zellen des Rete ovarii zu einer deutlichen Reaktion des Kerns. Wie im humanen Rete ovarii konnte ich in meiner Untersuchung das Vorkommen von Östrogen-Rezeptoren im Rete-Epithel nachweisen (KHAN et al. 1999). Die Reaktion fiel deutlich stärker als bei den Progesteron-Rezeptoren aus. Diese Beobachtung belegt, dass die Zellen des Rete ovarii mehr Östrogen- als Progesteron-Rezeptoren besitzen und somit vermutlich sensibler auf Östrogen, als auf Progesteron reagieren. Diese Beobachtung muss auch in Bezug zum Zyklusstadium betrachtet werden, da die Einwirkung verschiedener Hormone die Expression spezifischer Hormonrezeptoren verändert.

1.9. Thekadrüsen

Die Thekadrüsen sind in allen untersuchten Ovarien zu erkennen. Im Zentrum der in Form einer Drüse angeordneten Thekazellen befinden sich häufig zwischen dem Bindegewebe gelegene PAS- und Alzianblau-positive Substanzen. Die Morphologie einiger dieser Ansammlungen von Thekazellen ähnelt der antraler, atretischer Follikel. Es sind auch Übergangsstadien zu erkennen, die eine Entwicklung der Drüsen aus atretischen Follikeln vermuten lassen, wie schon bereits von anderen Autoren beobachtet (GURAYA 1979; PÉREZ et al. 1999).

Die glykohochemischen Untersuchungen zeigen in den Thekadrüsen eine positive Reaktion nach Inkubation mit FITC-markiertem Con A, VAA und

PHAE. Das Lumen zeigt eine deutliche Fluoreszenz bei WGA, WGAs und SNA sowie schwache Reaktionen bei PHAE. Dieses Ergebnis beweist das Vorkommen von Glukose und/oder Mannose sowie Sialinsäure und evtl. Galaktose in den Thekazellen sowie Sialinsäure, N-Acetyl-D-Glukosamin und evtl. N-Acetyl-D-Galaktosamin im Zentrum der Drüsen.

Der immunhistochemische Nachweis von Vimentin zeigt stark positive Reaktionen im Zytoplasma der Thekazellen. Diese fallen ähnlich wie in den Granulosaluteinzellen im Gelbkörper aus. Da sowohl die Thekazellen, als auch die Luteinzellen zur Steroidhormonsynthese befähigt sind könnte Vimentin eine Rolle bei der im Zytoplasma stattfindenden Steroidhormonsynthese spielen (SHEN et al. 2012).

Der Nachweis von Tubulin in den Thekadrüsen brachte in den Thekazellen selbst nur schwache Reaktionen im Zytoplasma. Lediglich das im Zentrum der Drüse befindliche Material, welches Reste von atretischen Follikeln sein dürften, zeigte starke Reaktionen. Die sich im Zytoplasma stark anfärbenden Zellen sind morphologisch den Follikelepithelzellen sehr ähnlich. Tubulin erfüllt als Bestandteil der Mikrotubuli auch in den Thekazellen zahlreiche Aufgaben, ist aber mit Hilfe des Tubulin-Antikörpers nicht in jeder Konformation nachweisbar.

Die immunhistochemische Färbung mit dem S100-Antikörper zeigt starke Reaktionen im Zytoplasma der Thekazellen. S100 interagiert mit den Mikrotubuli (DONATO 1986) und hat möglicherweise wie diese auch, Einfluss auf die Steroidhormonsynthese. Die Reaktion ist ähnlich wie in den Thekazellen der Theca interna und den Luteinzellen, die auch zur Hormonsynthese befähigt sind.

Connexin 43 erzielt starke Reaktionen im Zytoplasma der Thekazellen, deren Intensität vergleichbar mit der Anfärbung der Thekazellen aus der Theca interna ist. Neben der positiven Reaktion im Zytoplasma ist auch eine sehr starke Reaktion im Bereich des Golgi-Feldes zu detektieren, welche auf vermehrte Synthese von Connexinen hinweisen kann. Ebenso ist eine granuläre positive Reaktion im Zytoplasma zu beobachten. Diese deutet darauf hin, dass die Synthese von Connexin für die Bildung von „gapjunctions“ noch abläuft.

1.10. Keimdrüsenepithel

In den meisten Bereichen ist das Keimdrüsenepithel als flaches einschichtiges Epithel ausgebildet. Die Zellkerne sind queroval und im Zytoplasma sind zahlreiche Mitochondrien, Vesikel und Vakuolen zu erkennen, wie sie stoffwechselaktive oder sekretorisch aktive Zellen zeigen.

Die glykohistochemischen Untersuchungen zeigen sehr starke Reaktionen mit SNA und deutliche Reaktionen mit Con A, WGA, PHAE und schwache Reaktionen mit WGAs und PSA. Dies spricht für das Vorliegen von Sialinsäure, Glukose und/oder Mannose sowie N-Acetyl-D-Glukosamin und evtl. auch N-Acetyl-D-Galaktosamin. Eine neuere Untersuchung an aviären Ovarien erbrachte am Keimdrüsenepithel ähnliche Ergebnisse, allerdings wurde dort zusätzlich noch Galaktose nachgewiesen (RODLER & SINOWATZ).

Der immunhistochemische Nachweis von Zytokeratinen mit dem Panzytokeratin-Antikörper zeigt eine sehr stark positive Reaktion in allen Bereichen des Keimdrüsenepithels. Bei sämtlichen untersuchten Ovarien anderer Tierarten wurden ebenso Reaktionen verschiedener Zytokeratine detektiert (KHAN-DAWOOD et al. 1996; GILES et al. 2006; RICCARDI et al. 2007; AKIHARA et al. 2007; RODLER & SINOWATZ 2011; WENDL et al. 2012). Die Katze weist ebenso wie viele andere Spezies (Affen, Hühnern, Hunden, Wachteln und Rindern) aus Zytokeratinen aufgebaute Intermediärfilamente im Keimdrüsenepithel auf.

Das Oberflächenepithel des Ovars ist weiter stark positiv für Synemin. Dieses ist Bestandteil des Zytoskeletts und kommt häufig zusammen mit Desmin oder Vimentin vor. In meiner Untersuchung konnte im Ovar der Katze weder Desmin, noch Vimentin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde im Ovar der Wachtel eine positive Reaktion für Vimentin verzeichnet (RODLER & SINOWATZ 2011) und beim Hund sowohl Desmin als auch Vimentin detektiert (AKIHARA et al. 2007). Allerdings wurde in diesen Studien Synemin nicht berücksichtigt.

ER α wurde in den Zellkernen des Keimdrüsenepithels nachgewiesen. Die Expression der Rezeptoren unterschied sich in den einzelnen Schnitten. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass die Ausbildung der Östrogen-Rezeptoren (ER α) abhängig vom Zyklusstadium ist, in dem sich das entsprechende Ovar befindet.

Ebenso reagierten Randbereiche des Ovars am Übergang zum Mesovar deutlicher, als das dazwischenliegende Epithel. Das Vorhandensein von nukleären Östrogen-Rezeptoren im Keimdrüsenepithel zeigt auch, dass es sich um ein Gewebe handelt, welches vom Östrogenspiegel, der während des Zyklus stark variiert, beeinflusst wird. So werden vermutlich die Auf- und Abbauvorgänge oder sekretorischen Prozesse dieses variablen Epithels (BJERSING & CAJANDER 1975; VIGNE et al. 1994) unter anderem von Östrogen gesteuert.

Die Verteilung der Steroidhormonrezeptoren sowie sämtlicher zytoskelettaler Bestandteile spiegelt die aktuell im Ovar vorliegende Situation wieder. Sowohl die Rezeptoren, als auch das Zytoskelett unterliegen ständigen Auf- und Abbauvorgängen, um die jeweiligen Zellen anpassen zu können. Somit können sich die Ergebnisse innerhalb meiner Arbeit auch dadurch unterscheiden, dass die Eierstöcke in unterschiedlichen Zyklusstadien entnommen wurden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen meiner Arbeit wurde mittels moderner morphologischer Methoden das Ovar der Hauskatze (*Felis catus*) untersucht. Dabei wurden ausgewählte Ovarien von 25 Katzen im Alter von sieben Monaten bis neun Jahren zur histologischen, histochemischen, glykohistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchung verwendet.

Zur glykohistochemischen Untersuchung der ovarspezifischen Strukturen wurde eine Auswahl geeigneter Lektine getroffen. Hierfür wurden Concanavalin Agglutinin (Con A), Wheat germ Agglutinin (WGA), Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs), Sambucus nigra Agglutinin (SNA), Pisum sativum Agglutinin (PSA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Viscum album Agglutinin (VAA), Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA E), Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I), Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA L), Sophora japonica Agglutinin (SJA) und Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSA I) eingesetzt und die jeweiligen Ergebnisse mit Lektinstudien anderer Autoren verglichen. Besonders auffallend war die starke Reaktion von WGA in der Zona pellucida und in der Corona radiata, die deutlich stärker als die übrigen Granulosazellen reagierte. Auch WGAs zeigte Reaktionen in der Zona pellucida und in der Corona radiata, die deutlich schwächer als bei WGA ausfielen. SNA reagierte nur in der inneren Schicht der Zona pellucida. Diese Reaktionen zeigen das Vorkommen von N-Acetyl-D-Glukosamin, N-Acetyl-D-Galaktosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure an, die in der Zona pellucida enthalten sind, die sich in Fortsätzen zwischen den Corona radiata Zellen verzweigt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen Panzytokeratin, Vimentin, Laminin, Desmin, Synemin, Tubulin, SMA, S100, Connexin 43, Östrogen-Rezeptoren (ER α), sowie Progesteron-Rezeptoren erbrachten neue Erkenntnisse zum Aufbau des Zytoskeletts und zur Verteilung von Steroidhormonrezeptoren in den feline Ovarien. Das Keimdrüsenepithel enthält neben Zytokeratinen und Synemin auch nukleäre Östrogen-Rezeptoren, deren Expression zyklusabhängig zu sein scheint. Die Thekazellen der Thekadrüsen reagieren stark mit Antikörpern gegen Vimentin, S100 und Connexin 43, ähnlich wie die Thekazellen der Theca interna von Tertiärfollikeln.

Das Zytoskelett dieser beiden Zelltypen ist analog aufgebaut, da beide Steroidhormone synthetisieren und diese Zellfunktionen unter Beteiligung des Zytoskeletts ablaufen. Die Granulosaluteinzellen des Gelbkörpers, in denen ebenso Steroide synthetisiert werden, zeigen ein ähnliches Reaktionsmuster. Zusätzlich wurde auch Tubulin im Zytoplasma der Granulosaluteinzellen nachgewiesen, welches für den Transport der Substrate und Steroide eine entscheidende Rolle spielt. Die immunhistochemische Anfärbbarkeit der Thekaluteinzellen unterscheidet sich deutlich von der, der Granulosaluteinzellen. In den Thekaluteinzellen waren nur schwache Reaktionen auf den S100- und Tubulin-Antikörper zu erkennen, wohingegen dort vereinzelt nukleäre Progesteron-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Auch in den zwischen den Luteinzellen gelegenen Fibrozyten konnten Progesteronrezeptoren detektiert werden. Das Rete ovarii reagierte mit Antikörpern gegen Zytokeratine, Tubulin, Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren. In den Follikeln war immunhistochemisch nur mit Antikörpern gegen Synemin eine deutliche Reaktion in den Oozyten zu erkennen. Die Granulosazellen zeigten bei allen Follikelstadien mit dem Tubulin-Antikörper eine stark positive Reaktion. Der Connexin-Antikörper zeigt in den Follikelepithelzellen eine steigende Reaktionsstärke, bei zunehmender Follikelgröße, bedingt durch die Zunahme der „gapjunctions“. Im Gegensatz dazu nimmt die Reaktion des Vimentin-Antikörpers vom Primordial- zum Tertiärfollikel in den Granulosazellen ab.

Die Ausbildung der kernständigen ER α und Progesteron-Rezeptoren variiert je nach Zyklusstadium und hormonellen Einwirkungen auf das Ovar. Östrogen-Rezeptoren sind in den Follikelepithelzellen weniger Primärfollikel zu finden sowie im Epithel des Rete ovarii und dem Keimdrüsenepithel. Die Progesteron-Rezeptoren konnten in den Thekaschichten von Tertiärfollikeln nachgewiesen werden sowie im Gelbkörper in den Thekaluteinzellen und in einigen Fibrozyten. Auch das Rete ovarii zeigte in manchen Bereichen nukleär lokalisierte Progesteron-Rezeptoren.

Insgesamt weist das Ovar der Katze im Vergleich zu anderen Tierarten eine frühere Differenzierung zytoskelettaler Elemente und glykanhaltiger Strukturen im Follikel auf. Neben der bereits im Primärfollikel ausgebildeten Zona pellucida fällt vor allem die frühe Ausbildung von „gapjunctions“ und Vimentinfilamenten in den Granulosazellen auf. Bei der Katze ist die Verteilung des sauren S100

Proteins im Ovar grundlegend anders als bei verschiedenen bisher untersuchten Tierarten. Im Bereich der Steroidhormon-synthetisierenden Zellen war es besonders deutlich nachweisbar, was dafür spricht, dass S100 in die Synthesevorgänge gemeinsam mit Vimentin und Connexin involviert ist.

VII. SUMMARY

Immunohistochemical, glycohistochemical and ultrastructural studies of the feline ovary (*Felis catus*)

In my thesis 25 feline ovaries (*Felis catus*) were studied using histological, glycohistochemical, immunohistochemical and ultrastructural methods. Additionally to the different follicle stages, the ovarian stroma and the thecal glands were also evaluated.

For the glycohistochemical investigations, an appropriate panel of lectins was used, including Concanavalin Agglutinin (Con A), Wheat germ Agglutinin (WGA), Wheat germ Agglutinin succinylated (WGAs), Sambucus nigra Agglutinin (SNA) , Pisum sativum Agglutinin (PSA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Viscum album Agglutinin (VAA), Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA E), Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I), Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA L), Sophora japonica Agglutinin (SJA) and Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSA I). The most interesting glycohistochemical staining was the strong reaction of WGA in the zona pellucida and the surrounding corona radiata cells. The staining with WGA-FITC demonstrates N-acetylglucosamine and sialic acids in the zona pellucida and the surrounding corona radiata.

The immunohistochemical examination using antibodies against cytokeratins, vimentin, laminin, desmin, synemin, tubulin, SMA, S100, connexin 43, ER α and progesterone receptors showed the localization of cytoskeletal components within the different compartments of the feline ovary and the distribution of steroid hormone receptors. The ovarian surface epithelium contains not only cytokeratins but also synemin and nuclear estrogen receptors. The interstitial gland cells show a strong immunohistochemical staining with antibodies against vimentin, S100 and connexin 43. A similar immunohistochemical staining pattern was also observed in cells of the theca interna of tertiary follicles. The immunohistochemical staining pattern differs between the luteal cells derived from granulosa cells (granulosa lutein cells) or from thecal cells (theca lutein cells). The small theca cells only showed a distinct reaction with tubulin and S100 antibodies, in contrast to the large luteal cells which reacted much more strongly.

In the rete ovarii the expression of cytokeratins, tubulin, progesterone receptors and ER α could be immunohistochemically demonstrated. Oocytes of the follicles of different developmental stages only showed a positive reaction with the synemin antibody. At all developmental stages, the follicle cells showed a strong immunohistochemical staining with the tubulin antibody. The intensity of connexin immunostaining increased during follicular development within the follicular epithelium from primordial to tertiary follicles. This proves the increase in the number of gap junctions in the follicular epithelium during follicle growth. In contrast the staining intensity with the vimentin antibody decreased in granulosa cells from primordial to tertiary follicles. This may indicate the remodelling of the cytoskeleton of the granulosa cells in growing follicles to obtain steroidogenic potential.

The formation of nuclear ER α and progesterone receptors varies under the influence of different hormones, depending on the ovarian cycle. The rete ovarii is the only structure in which both receptor types are expressed. ER α can be detected in granulosa cells of some primary follicles, as well as in the ovarian surface epithelium. Progesterone receptors are localized in the theca interna of tertiary follicles and in small luteal cells and fibrocytes of the corpus luteum.

In conclusion the feline ovary shows, in comparison to other mammals, an early differentiation of cytoskeletal and glykan containing elements. The zona pellucida is already formed in primary follicles and the granulosa cells contain vimentin filaments and gap junctions, which can already be observed in the stage of primordial follicle. The distribution of the S100 protein in the ovary of the cat differs fundamentally from all other species investigated so far. S100 was predominantly found in steroidogenic cells and may indicate its involvement in steroidogenesis, in conjunction with the expression of vimentin and connexin.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Akihara, Y.; Shimoyama, Y.; Kawasaki, K.; Komine, M.; Hirayama, K.; Terasawa, A. et al. (2007):** Histological and immunohistochemical evaluation of canine ovary. In: *Reproduction in Domestic Animals* 42: S. 495–501
- Albertini, D. F.; Fawcett, D. W.; Olds, P. J. (1975):** Morphological variations in gap junctions of ovarian granulosa cells. In: *Tissue and Cell* 7: S. 389–405
- Alberts, B. (2011):** Molekularbiologie der Zelle. 5., vollst. überarb. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Alfa, C. E.; Hyams, J. S. (1991):** Cell biology. ABG of microtubule assembly. In: *Nature* 352: S. 471
- Amselgruber, W. (1983):** Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Oogenese der Katze (*Felis catus*). In: *Anatomia Histologia Embryologia* 12: S. 167–188
- Arikan, S.; Yigit, A. A.; Kalender, H. (2009):** Size Distribution of Luteal Cells During Pseudopregnancy in Domestic Cats. In: *Reproduction in Domestic Animals* 44: S. 842–845
- Barber, M. R.; Lee, S. M.; Steffens, W. L.; Ard, M.; Fayrer-Hosken, R. A. (2001):** Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. In: *Theriogenology* 55: S. 1705–1717
- Beers, W. H.; Strickland, S.; Reich, E. (1975):** Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation. In: *Cell* 6: S. 387–394
- Berisha, B.; Bridger, P.; Toth, A.; Kliem, H.; Meyer, H. H.D.; Schams, D.; Pfarrer, C. (2009):** Expression and Localization of Gap Junctional Connexins 26 and 43 in Bovine Perioovulatory Follicles and in Corpus Luteum During Different Functional Stages of Oestrous Cycle and Pregnancy. In: *Reproduction in Domestic Animals* 44: S. 295–302
- Berkholtz, C. B.; Lai, B. E.; Woodruff, T. K.; Shea, L. D. (2006):** Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. In: *Histochemistry and Cell Biology* 126: S. 583–592

- Bilak, S. R.; Sernett, S. W.; Bilak, M. M.; Bellin, R. M.; Stromer, M. H.; Huiatt, T. W.; Robson, R. M. (1998):** Properties of the novel intermediate filament protein synemin and its identification in mammalian muscle. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 355: S. 63–76
- Bjersing, L.; Cajander, S. (1975):** Ovulation and the role of the ovarian surface epithelium. In: *Experientia* 31: S. 605–608
- Bordasch, I. (1998):** Histologische, lektin- und immunhistochemische Untersuchungen am Ovar der Katze (*Felis domestica*). Dissertationsschrift der tierärztlichen Fakultät, München.
- Borowczyk, E.; Johnson, M. L.; Bilski, J. J.; Bilska, M. A.; Redmer, D. A.; Reynolds, L. P.; Grazul-Bilska, A. T. (2007):** Role of gap junctions in regulation of progesterone secretion by ovine luteal cells in vitro. In: *Reproduction* 133: S. 641–651
- Borowczyk, E.; Johnson, M. L.; Bilski, J. J.; Borowicz, P. P.; Redmer, D. A.; Reynolds, L. P.; Grazul-Bilska, A. T. (2006):** Expression of gap junctional connexins 26, 32, and 43 mRNA in ovarian preovulatory follicles and corpora lutea in sheep. In: *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84: S. 1011–1020
- Boyd, W. C.; Shapleigh, E. (1954):** Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). In: *Science* 119: S. 419
- Braun, B. C.; Ringleb, J.; Waurich, R.; Viertel, D.; Jewgenow, K. (2009):** Functional role of feline zona pellucida protein 4 trefoil domain: a sperm receptor or structural component of the domestic cat zona pellucida? In: *Reproduction in Domestic Animals* 44: S. 234–238
- Bristol-Gould, S.; Woodruff, T. K. (2006):** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). In: *Theriogenology* 66: S. 5–13
- Buccione, R.; Schroeder, A. C.; Eppig, J. J. (1990):** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. In: *Biology of Reproduction* 43: S. 543–547
- Burden, H. W. (1973):** The distribution of smooth muscle in the cat ovary with a note on its adrenergic innervation. In: *Journal of Morphology* 140: S. 467–475

- Burden, H. W. (1972):** Ultrastructural observations on ovarian perfollicular smooth muscle in the cat, guinea pig, and rabbit. In: *American Journal of Anatomy* 133: S. 125–141
- Busch, W.; Schulz, J.; Zerobin K. (Hg.) (2009):** Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren. Studien-Sonderausgabe der 1. Auflage. Stuttgart: Enke.
- Byers, A. P.; Barone, M. A.; Donoghue, A. M.; Wildt, D. E. (1992):** Mature domestic cat oocyte does not express a cortical granule-free domain. In: *Biology of Reproduction* 47: S. 709–715
- Byskov, A. G. (1974):** Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. In: *Reproduction* 37: S. 277–285
- Byskov, A. G. (1975):** The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 45: S. 201–209
- Byskov, A. G.; Skakkebaek, N. E.; Stafanger, G.; Peters, H. (1977):** Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. In: *Journal of Anatomy* 123: S. 77–86
- Carrijo Jr., O. A.; Marinho, A.P.S.; Campos, A. A.; Amorim, C. A.; Bão, S. N.; Lucci, C. M. (2010):** Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. In: *Cells Tissues Organs* 191: S. 152–160
- Cheng, Y.; Inoue, N.; Matsuda-Minehata, F.; Goto, Y.; Maeda, A.; Manabe, N. (2005):** Changes in expression and localization of connexin 43 mRNA and protein in porcine ovary granulosa cells during follicular atresia. In: *Journal of Reproduction and Development* 51: S. 627–637
- Clark, L. J.; Irving-Rodgers, H. F.; Dharmarajan, A. M.; Rodgers, R. J. (2004):** Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. In: *Biology of Reproduction* 71: S. 1071–1078
- Clemens, J. W.; Robker, R. L.; Kraus, W. L.; Katzenellenbogen, B. S.; Richards, J. S. (1998):** Hormone induction of progesterone receptor (PR) messenger ribonucleic acid and activation of PR promoter regions in ovarian granulosa cells: evidence for a role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate but not estradiol. In: *Molecular Endocrinology* 12: S. 1201–1214

- Dawson, A. B. (1941):** The development and morphology of the corpus luteum of the cat. In: *The Anatomical Record* 79: S. 155–177
- Dederer, P. H. (1934):** Polyovular follicles in the cat. In: *The Anatomical Record* 60: S. 391–403
- Donato, R. (1986):** S-100 proteins. In: *Cell Calcium* 7: S. 123–145
- Donato, R.; Cannon, B. R.; Sorci, G.; Riuzzi, F.; Hsu, K.; Weber, D. J.; Geczy, C. L. (2013):** Functions of S100 proteins. In: *Current Molecular Medicine* 13: S. 24–57
- Eriksson, J. E.; Dechat, T.; Grin, B.; Helfand, B.; Mendez, M.; Pallari, H.-M.; Goldman, R. D. (2009):** Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. In: *Journal of Clinical Investigation* 119: S. 1763–1771
- Espinosa de los Monteros, A.; Fernandez, A.; Millan, M. Y.; Rodriguez, F.; Herraiz, P.; Martin de las Mulas, J (1999):** Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. In: *Veterinary Pathology* 36: S. 179–190
- Fortune, J. E. (1994):** Ovarian follicular growth and development in mammals. In: *Biology of Reproduction* 50: S. 225–232
- Frewein, J.; Vollmershaus, B. (Hg.) (1994):** Anatomie von Hund und Katze. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Gabbiani, G.; Schmid, E.; Winter, S.; Chaponnier, C.; Ckhastonay, C. de; Vandekerckhove, J. et al. (1981):** Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78: S. 298–302
- Gabius, H.-J. (2009):** The sugar code. Fundamentals of glycosciences. Weinheim: Wiley-VCH.
- Gabius, H.-J.; Rüdiger, H.; Uhlenbruck, G. (1988):** Lektine. In: *Spektrum der Wissenschaft*. S. 50–60.
- Gabius, H.-J.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Solís, D. (2011):** From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. In: *Trends in Biochemical Sciences* 36: S. 298–313

- Gelberg, H. B.; McEntee, K.; Heath, E. H. (1984):** Feline cystic rete ovarii. In: *Veterinary Pathology* 21: S. 304–307
- Gelfand, V. I.; Bershadsky, A. D. (1991):** Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. In: *Annual Review of Cell Biology* 7: S. 93–116
- Gerhart, S. V.; Eble, D. M.; Burger, R. M.; Oline, S. N.; Vacaru, A.; Sadler, K. C. et al. (2012):** The Cx43-like Connexin Protein Cx40.8 Is Differentially Localized during Fin Ontogeny and Fin Regeneration. In: *PLoS ONE* 7: S. e31364
- Gershon, E.; Plaks, V.; Dekel, N. (2008):** Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 282: S. 18–25
- Giles, J. R.; Olson, L. M.; Johnson, P. A. (2006):** Characterization of ovarian surface epithelial cells from the hen: a unique model for ovarian cancer. In: *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 231: S. 1718–1725
- Goldstein, I. J. (1980):** What should be called al lectin? In: *Nature* 285: S. 66
- Goldstein, I. J.; Poretz, R. D. (1986):** Isolation, physiochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins. In: The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. In: *Academic Press, Orlando*. S. 35-250
- Gracanin, A.; van Wolferen, M. E.; Sartorius, C. A.; Brenkman, A. B.; Schoonen, W. G.; Mol, J. A. (2012):** Canid progesterone receptors lack activation function 3 domain-dependent activity. In: *Endocrinology* 153: S. 6104–6113
- Granger, B. L.; Lazarides, E. (1979):** Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. In: *Cell* 18: S. 1053–1063
- Granger, B. L.; Lazarides, E. (1980):** Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. In: *Cell* 22: S. 727–738
- Gulyas, B. J. (1980):** Cortical granules of mammalian eggs. In: *International Review of Cytology* 63: S. 357–392
- Gupta, S. K.; Bhandari, B.; Shrestha, A.; Biswal, B. K.; Palaniappan, C.; Malhotra, S.; Gupta, N. (2012):** Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. In: *Cell and Tissue Research* 349: S. 665–678

- Guraya, S. S. (1969):** Some observations on the histochemical features of developing follicle and corpus luteum in the cat and dog ovary. In: *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 19: S. 351–362
- Guraya, S. S. (1979):** Morphology of the civet cat (*Paradoxurus hermaphroditus*) ovary during the follicular phase. In: *Archivio italiano di anatomia e di embriologia* 84: S. 321–336
- Guraya, S. S. (1981):** Histochemical observations on the civet cat (*Paradoxurus hermaphroditus*) ovary during the period of follicular activity. In: *Archivio italiano di anatomia e di embriologia* 86: S. 71–82
- Guraya, S. S.; Greenwald, G. S. (1964):** A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. In: *Anatomical Record* 149: S. 411–433
- Herrmann, H.; Bar, H.; Kreplak, L.; Strelkov, S. V.; Aebi, U. (2007):** Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. In: *Nature Reviews of Molecular Cell Biology* 8: S. 562–573
- Hervé, J.-C. (2004):** The connexins. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: S. 1–2
- Hervé, J.-C. (2005):** The connexins, Part II. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1711: S. 97–98
- Hervé, J.-C. (2005):** The connexins, Part III. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1719: S. 1–2
- Hervé, J.-C.; Derangeon, M. (2013):** Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. In: *Cell and Tissue Research* 352: S. 21–31
- Hirschberg, R. M.; Plendl, J.; Kaessmeyer, S. (2012):** Alpha smooth muscle actin in the cycling ovary - an immunohistochemical study. In: *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 50: S. 113–129
- Hsu, S. M.; Raine, L. (1981):** Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29: S. 1349–1353
- Hughes, F. M.; Gorospe, W. C. (1991):** Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. In: *Endocrinology* 129: S. 2415–2422

Hyder, C. L.; Pallari, H.-M.; Kochin, V.; Eriksson, J. E. (2008): Providing cellular signposts – Post-translational modifications of intermediate filaments. In: *FEBS Letters* 582: S. 2140–2148

Industrieverband Heimtierbedarf (IVH) e.V. (1999-2012): Zahlen zum deutschen Heimtiermarkt. Populationszahlen. Pressemitteilungen.

Irving-Rodgers, H. F.; Catanzariti, K. D.; Aspden, W. J.; D'Occhio, M. J.; Rodgers, R. J. (2006): Remodeling of extracellular matrix at ovulation of the bovine ovarian follicle. In: *Molecular Reproduction and Development* 73: S. 1292–1302

Irving-Rodgers, H. F.; Harland, M. L.; Rodgers, R. J. (2004): A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle. In: *Matrix Biology* 23: S. 207–217

Irving-Rodgers, H. F.; Hummitzsch, K.; Murdiyarso, L. S.; Bonner, W. M.; Sado, Y.; Ninomiya, Y. et al. (2010): Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. In: *Cell and Tissue Research* 339: S. 613–624

Iwatsuki, H.; Suda, M. (2010): Seven Kinds of Intermediate Filament Networks in the Cytoplasm of Polarized Cells: Structure and Function. In: *Acta Histochemica et Cytochemica* 43: S. 19–31

Jastrow, H. (1998): Elektronenmikroskopischer Atlas von Zelle, Geweben und Organen im Internet. Hg. v. Dr. med H. Jastrow. Mainz. Internetdokument: Online verfügbar unter <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAlles.html>

Jewgenow, K. (1996): Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. In: *Theriogenology* 45: S. 889–895

Jewgenow, K.; Amelkina, O.; Painer, J.; Göritz, F.; Dehnhard, M. (2012): Life Cycle of Feline Corpora lutea. Histological and Intraluteal Hormone Analysis. In: *Reproduction of Domestic Animals* 47: S. 25–29

Jewgenow, K.; Fickel, J. (1999): Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. In: *Biology of Reproduction* 60: S. 522–526

- Jewgenow, K.; Rudolph, M. (2001):** Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats—an ultrastructural immunohistological investigation. In: *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 57*: S. 23–29
- Jewgenow, K.; Stolte, M. (1996):** Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. In: *Animal Reproduction Science* 44: S. 183–193
- Johnson, M. L.; Redmer, D. A.; Reynolds, L. P.; Grazul-Bilska, A. T. (1999):** Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. In: *Endocrine* 10: S. 43–51
- Kaipia, A.; Hsueh, A. J. (1997):** Regulation of ovarian follicle atresia. In: *Annual Review of Physiology* 59: S. 349–363
- Kamiya, S.; Tsukushi, M.; Yamano, S.; Daigo, M. (1989):** S-100 protein-immunoreactive cells in the bovine ovary. In: *Anatomical Record* 223: S. 384–386
- Khan, M. S.; Dodson, A. R.; Heatley, M. K. (1999):** Ki-67, oestrogen receptor, and progesterone receptor proteins in the human rete ovarii and in endometriosis. In: *Journal of Clinical Pathology* 52: S. 517–520
- Khan-Dawood, F. S.; Yusoff Dawood, M.; Tabibzadeh, S. (1996):** Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. In: *Biology of Reproduction* 54: S. 734–742
- Kimura, J.; Matsumoto, Y.; Tsukise, A.; Okano, M. (1989):** Cytochemistry of glycoconjugates in the zona pellucida of the cat. In: *Nihon Juigaku Zasshi* 51: S. 1091–1094
- Kingsbury, B.F. (1913-1914):** The morphogenesis of the mammalian ovary: felis domestica. *Department of Histology and Embryology, Cornell University* S. 345–387
- Kohata, Y.; Gupta, P. D.; Yasuzumi, F. (2007):** Stereo-electron microscopy of the ovarian follicles of cat and mouse. In: *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 83: S. 97–106
- Konecny, M. (1959):** Contribution to the microscopic histochemistry of the interstitial cells and of the corpus luteum of the ovary of the cat. In: *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 153: S. 898–899

- König, H. E.; Liebich, H.-G. (2011):** Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer.
- Korfsmeier, K. H. (1983):** Oocytes in primordial follicles of the immature cat (*Felis domestica*). In: *Anatomischer Anzeiger* 154: S. 283–292
- Kumari, U.; Yashpal, M.; Mittal, S.; Mittal, A. K. (2009):** Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the gill epithelium of a catfish, *Rita rita* (Siluriformes, Bagridae). In: *Tissue and Cell* 41: S. 271–280
- Lazarides, E. (1982):** Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. In: *Annual Review of Biochemistry* 51: S. 219–250
- Lazarides, E.; Granger, B. L.; Gard, D. L.; O'Connor, C. M.; Breckler, J.; Price, M.; Danto, S. I. (1982):** Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 46: S. 351–378
- Lee, V. H.; Britt, J. H.; Dunbar, B. S. (1996):** Localization of laminin proteins during early follicular development in pig and rabbit ovaries. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 108: S. 115–122
- Liebich, H.-G. (2010):** Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, 5. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Schattauer.
- Lis, H.; Sharon, N. (1986):** Lectins as molecules and as tools. In: *Annual Review of Biochemistry* 55: S. 35–67
- Lohr, M.; Kaltner, H.; Schwartz-Albiez, R.; Sinowatz, F.; Gabius, H.-J (2010):** Towards functional glycomics by lectin histochemistry: strategic probe selection to monitor core and branch-end substitutions and detection of cell-type and regional selectivity in adult mouse testis and epididymis. In: *Anatomia Histologia Embryologia* 39: S. 481–493
- Luciano, A. M.; Chigioni, S.; Lodde, V.; Franciosi, F.; Luvoni, G. C.; Modina, S. C. (2009):** Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. In: *Cryobiology* 59: S. 90–95

- Lunn, M. O.; Wright, S. J. (2009):** Imaging the Zona Pellucida of Canine and Feline Oocytes Using Scanning Electron Microscopy. In: *Microscopy and Microanalysis* 15: S. 2–14
- Madekurozwa, M.-C. (2012):** An Immunohistochemical Study of Ovarian Follicle Histogenesis in the Early Post-hatch Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). In: *Anatomia, Histologia, Embryologia* 41: S. 79–86
- Maurizii, M. G.; Alibardi, L.; Taddei, C. (2004):** alpha-Tubulin and acetylated alpha-tubulin during ovarian follicle differentiation in the lizard *Podarcis sicula* Raf. In: *Journal of Experimental Zoology Part A Comparative Experimental Biology* 301: S. 532–541
- Maurizii, M. G.; Taddei, C. (2012):** Microtubule organization and nucleation in the differentiating ovarian follicle of the lizard *Podarcis sicula*. In: *Journal of Morphology* 273: S. 1089–1095
- Maybin, J. A.; Duncan, W. C. (2004):** The human corpus luteum: which cells have progesterone receptors? In: *Reproduction* 128: S. 423–431
- Mirecka, J.; Brinck, U.; Korabiowska, M.; Schauer, A. (1994):** Localization of S-100 protein in pig ovarian structures. In: *Folia Histochemica et Cytobiologica* 32: S. 177–180
- Mislin, H. (1961):** Experimental detection of autochthonous automatism of lymph vessels. In: *Experientia* 17: S. 29–30
- Monsigny, M.; Roche, A. C.; Sene, C.; Maget-Dana, R.; Delmotte, F. (1980):** Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? In: *European Journal of Biochemistry* 104: S. 147–153
- Montano, M. M.; Muller, V.; Trobaugh, A.; Katzenellenbogen, B. S. (1995):** The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. In: *Molecular Endocrinology* 9: S. 814–825
- Moore, B. W. (1965):** A soluble protein characteristic of the nervous system. In: *Biochemical and Biophysical Research Communication* 19: S. 739–744
- Motta, P.; Columbis P.; Didio L. (1975):** Unusual arrangement of agranular endoplasmic reticulum in the interstitial cells of the cat ovary. In: *Fertility and Sterility* 26: S. 346–352

Murphy, B. D. (2000): Models of luteinization. In: *Biology of Reproduction* 63: S. 2–11

Natraj, U.; Richards, J. S. (1993): Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. In: *Endocrinology* 133: S. 761–769

Nesci, E.; Motta, P. (1970): The fine structure of the interstitial tissue in the cat ovary. In: *Biology Letters* 22: S. 1–13

Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (2004): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II: Eingeweide. 9. Aufl.: Parey-Verlag.

Nilsson, I.; Mattsson, M. O.; Selstam, G. (1995): Presence of the intermediate filaments cytokeratins and vimentin in the rat corpus luteum during luteal life-span. In: *Histochemistry and Cell Biology* 103: S. 237–242

Niswender, G. D.; Juengel, J. L.; Silva, P. J.; Rollyson, M. K.; McIntush, E. W. (2000): Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. In: *Physiological Reviews* 80: S. 1–29

Okamura, H.; Virutamases, P.; Wright, K. H.; Wallach, E. E. (1972): Ovarian smooth muscle in the human being, rabbit, and cat. Histochemical and electron microscopic study. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 112: S. 183–191

Okuda, Y.; Okamura, H.; Kanzaki, H.; Takenaka, A. (1983): Capillary permeability of rabbit ovarian follicles prior to ovulation. In: *Journal of Anatomy* 137: S. 263–269

Paape, S. R.; Shille, V. M.; Seto, H.; Stabenfeldt, G. H. (1975): Luteal activity in the pseudopregnant cat. In: *Biology of Reproduction* 13: S. 470–474

Parillo, F.; Fagioli, O.; Dall'Aglio, C.; Verini-Supplizi, A. (2000): Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocytes. In: *Acta Histochemica* 102: S. 193–202

Parillo, F.; Stradaoli, G.; Dall'Aglio, C.; Verini-Supplizi, A. (1996): Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. In: *Veterinary Research Communications* 20: S. 225–236

- Parillo, F.; Verini-Supplizi, A. (1999):** Glycohistochemical investigation of canine and feline zonae pellucidae of preantral and antral oocytes. In: *Acta Histochemica* 101: S. 127–146
- Payan-Carreira, R.; Pires, M. A. (2008):** Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. In: *Theriogenology* 69: S. 977–982
- Pedersen, T.; Peters, H. (1968):** Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 17: S. 555–557
- Peréz, J. F.; Conley, A. J.; Dieter, J. A.; Sanz-Ortega, J.; Lasley, B. L. (1999):** Studies on the origin of ovarian interstitial tissue and the incidence of endometrial hyperplasia in domestic and feral cats. In: *General and Comparative Endocrinology* 116: S. 10–20
- Peréz-Armendariz, E. M.; Saez, J. C.; Bravo-Moreno, J. F.; Lopez-Olmos, V.; Enders, G. C.; Villalpando, I. (2003):** Connexin43 is expressed in mouse fetal ovary. In: *Anatomical Record Part A, Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology* 271: S. 360–367
- Qin, Z.; Buehler, M. J.; Kreplak, L. (2010):** A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. In: *Journal of Biomechanics* 43: S. 15–22
- Reynaud, K.; Gicquel, C.; Thoumire, S.; Chebrout, M.; Ficheux, C.; Bestandji, M.; Chastant-Maillard, S. (2009):** Folliculogenesis and Morphometry of Oocyte and Follicle Growth in the Feline Ovary. In: *Reproduction in Domestic Animals* 44: S. 174–179
- Reynaud, K.; Halter, S.; Tahir, Z.; Thoumire, S.; Chebrout, M.; Chastant-Maillard, S. (2010):** Les follicules polyovocytaires. In: *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 38: S. 395–397
- Riccardi, E.; Greco, V.; Verganti, S.; Finazzi, M. (2007):** Immunohistochemical Diagnosis of Canine Ovarian Epithelial and Granulosa Cell Tumors. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19: S. 431–435
- Rodgers, R. J.; Irving-Rodgers, H. F. (2010):** Morphological classification of bovine ovarian follicles. In: *Reproduction* 139: S. 309–318

- Rodler, D. (2009):** Histologische, Histochemische und Ultrastrukturelle Untersuchungen am Ovar der Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*). Dissertationsschrift der tierärztlichen Fakultät. München.
- Rodler, D.; Sinowatz, F. (2011):** Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the ovarian surface epithelium of Japanese quail. In: *Animal Science Journal* 82 (2), S. 307–313
- Rodler, D.; Sinowatz, F. (2013):** Expression of Intermediate Filaments in the Balbiani Body and Ovarian Follicular Wall of the Japanese Quail (*Coturnix japonica*). In: *Cells Tissues Organs* 197: S. 298–311
- Rohde, H.; Wick, G.; Timpl, R. (1979):** Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. In: *European Journal of Biochemistry* 102: S. 195–201
- Romeis, B.; Mulisch, M.; Welsch, U. (2010):** Romeis Mikroskopische Technik. 18. Aufl. Dordrecht: Springer.
- Roth, J. (2011):** Lectins for histochemical demonstration of glycans. In: *Histochemistry and Cell Biology* 136: S. 117–130
- Rüdiger, H. (1981):** Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. In: *Chemie in unserer Zeit* 15: S. 155–162
- Rüdiger, H. (1982):** Phythemagglutinins. In: *Planta Medica* 46: S. 3–9
- Rüdiger, H. (1998):** Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. In: *Acta Anatomica (Basel)* 161: S. 130–152
- Rüsse, I.; Sinowatz, F. (2010):** Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 3., durchgesehene Ausg. München: Lehmanns.
- Saidapur, S. K. (1978):** Steroidogenic cellular sites in the cat ovary: a histochemical study. In: *General and Comparative Endocrinology* 35: S. 475–480
- Sasseville, M.; Gagnon, M.-C.; Guillemette, C.; Sullivan, R.; Gilchrist, R. B.; Richard, F. J. (2009):** Regulation of Gap Junctions in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes: Contributions of Granulosa Cell Contact, Gonadotropins, and Lipid Rafts. In: *Molecular Endocrinology* 23: S. 700–710

- Schmidt, P. M.; Chakraborty, P. K.; Wildt, D. E. (1983):** Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus. In: *Biology of Reproduction* 28: S. 657–671
- Schweizer, J.; Bowden, P. E.; Coulombe, P. A.; Langbein, L.; Lane, E. B.; Magin, T. M. et al. (2006):** New consensus nomenclature for mammalian keratins. In: *Journal of Cell Biology* 174: S. 169–174
- Sharon, N.; Lis, H. (1972):** Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. In: *Science* 177: S. 949–959
- Sharon, N.; Lis, H. (2004):** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. In: *Glycobiology* 14: S. 53–62
- Shehata, R. (1974):** Polyovular Graafian follicles in a newborn kitten with a study of polyovuly in the cat. In: *Acta Anatomica (Basel)* 89: S. 21–30
- Shen, W.-J.; Zaidi, S. K.; Patel, S.; Cortez, Y.; Ueno, M.; Azhar, R. et al. (2012):** Ablation of Vimentin Results in Defective Steroidogenesis. In: *Endocrinology* 153: S. 3249–3257
- Shille, V. M.; Lundstrom, K. E.; Stabenfeldt, G. H. (1979):** Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. In: *Biology of Reproduction* 21: S. 953–963
- Shille, V. M.; Munro, C.; Farmer, S. W.; Papkoff, H.; Stabenfeldt, G. H. (1983):** Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 69: S. 29–39
- Shille, V. M.; Stabenfeldt, G. H. (1979):** Luteal function in the domestic cat during pseudopregnancy and after treatment with prostaglandin F2 alpha. In: *Biology of Reproduction* 21: S. 1217–1223
- Sinowatz, F.; Topfer-Petersen, E.; Kolle, S.; Palma, G. (2001):** Functional morphology of the zona pellucida. In: *Anatomia Histologia Embryologia* 30: S. 257–263
- Sinowatz, F.; Hees, H. (2012):** Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 5. Aufl. München: Selbstverlag.

- Skinner, S. M.; Dunbar, B. S. (1992):** Localization of a carbohydrate antigen associated with growing oocytes and ovarian surface epithelium. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40: S. 1031–1036
- Skutelsky, E.; Ranen, E.; Shalgi, R. (1994):** Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 100: S. 35–41
- Smith, C. C.T.; Yellon, D. M. (2011):** Necroptosis, necrostatins and tissue injury. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15: S. 1797–1806
- Stewart, M. (1990):** Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. In: *Current Opinion in Cell Biology* 2: S. 91–100
- Sugimura, M.; Miura, M.; Suzuki, Y.; Atoji, Y. (1989):** S-100 immunoreactive cells in non-nervous duck tissues. In: *Avian Pathology* 18: S. 503–510
- Telfer, E.; Gosden, R. G. (1987):** A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). In: *Journal of Reproduction and Fertility* 81: S. 137–147
- Timpl, R. (1989):** Structure and biological activity of basement membrane proteins. In: *European Journal of Biochemistry* 180: S. 487–502
- Timpl, R.; Rohde, H.; Robey, P. G.; Rennard, S. I.; Foidart, J. M.; Martin, G. R. (1979):** Laminin-a glycoprotein from basement membranes. In: *Journal of Biological Chemistry* 254: S. 9933–9937
- Tsutsui, T.; Stabenfeldt, G. H. (1993):** Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. In: *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 47: S. 29–35
- Ulfig, N. (2009):** Kurzlehrbuch Embryologie. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- van Wezel, I. L.; Rodgers, H. F.; Rodgers, R. J. (1998):** Differential localization of laminin chains in bovine follicles. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 112: S. 267–278
- Vermeirsch, H. (2001):** Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. In: *Reproduction* 122: S. 73–83

- Vigne, J. L.; Halburnt, L. L.; Skinner, M. K. (1994):** Characterization of bovine ovarian surface epithelium and stromal cells: identification of secreted proteins. In: *Biology of Reproduction* 51: S. 1213–1221
- Wang, W.; Liu, H.; Tian, W.; Zhang, F.; Gong, Y.; Chen, J. et al. (2010):** Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. In: *Journal of Zhejiang University. Science B* 11: S. 307–314
- Wassarman, P. M. (1988):** Zona pellucida glycoproteins. In: *Annual Review of Biochemistry* 57: S. 415–442
- Wassarman, P. M. (2008):** Zona Pellucida Glycoproteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 283: S. 24285–24289
- Wendl, J.; Ebach, K.; Rodler, D.; Kenngott, R. A.-M. (2012):** Immunocytochemical Localization of Cytoplasmic and Nuclear Intermediate Filaments in the Bovine Ovary during Folliculogenesis. In: *Anatomia Histologia Embryologia* 41: S. 190–201
- Wenzel, J. G.; Odend'hal, S. (1985):** The mammalian rete ovarii: a literature review. In: *Cornell University College of Veterinary Medicine* 75: S. 411–425
- Wilkerson, W. V. (1923):** The rete ovarii as a normal structure of the adult mammalian ovary. In: *Anatomical Record* 26: S. 75–77
- Woolnough, E.; Russo, L.; Khan, M. S.; Heatley, M. K. (2000):** An immunohistochemical study of the rete ovarii and epoophoron. In: *Pathology* 32: S. 77–83
- Wordinger, R. J.; Rudick, V. L.; Rudick, M. J. (1983):** Immunohistochemical localization of laminin within the mouse. In: *Journal of Experimental Zoology* 228: S. 141–143
- Wu, A. M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z. (2009):** Lectins as tools in glycoconjugate research. In: *Glycoconjugate Journal* 26: S. 899–913
- Zöllner, F.; Hein, E. (2000):** Proteine in der Bioinformatik. Internetdokument: Online verfügbar unter <http://www.techfak.uni-bielefeld.de/~sneumann/proteine-ws99/flexx/node11.html>.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Bild 1: Ovarien einer Katze nach Entnahme durch Ovariektomie</i>	<i>3</i>
<i>Bild 2: Ovar Katze, Ovarrinde, HE-Färbung</i>	<i>46</i>
<i>Bild 3: Ovar Katze, Übersicht, van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung</i>	<i>46</i>
<i>Bild 4: Ovar Katze, Gelbkörper, Zentrum der Thekadrüse, PAS-Färbung.....</i>	<i>48</i>
<i>Bild 5: Ovar Katze, Thekadrüse, van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung.....</i>	<i>48</i>
<i>Bild 6: Ovar Katze, atretischer Follikel, PAS-Färbung</i>	<i>48</i>
<i>Bild 7: Ovar Katze, Gelbkörper in Rückbildung, van Gieson-Resorcinfuchsin- Färbung.....</i>	<i>50</i>
<i>Bild 8: Ovar Katze, Gelbkörper, Goldner-Färbung.....</i>	<i>50</i>
<i>Bild 9: Ovar Katze, Gelbkörper, PAS-Färbung.....</i>	<i>50</i>
<i>Bild 10: Ovar Katze, Keimdrüsenepithel, Goldner-Färbung.....</i>	<i>52</i>
<i>Bild 11: Ovar Katze, Ovarrinde mit Keimdrüsenepithel, Alzianblau pH 2,5.....</i>	<i>52</i>
<i>Bild 12: Ovar Katze, Ovarrinde mit Keimdrüsenepithel, van Gieson-Resorcinfuchsin- Färbung.....</i>	<i>52</i>
<i>Bild 13: Ovar Katze, konnektives Rete, Goldner-Färbung.....</i>	<i>54</i>
<i>Bild 14: Ovar Katze, Rete ovarii, van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung</i>	<i>54</i>
<i>Bild 15: Ovar Katze, Rete ovarii, PAS-Färbung.....</i>	<i>54</i>
<i>Bild 16: Ovar Katze, Rete ovarii, Goldner-Färbung.....</i>	<i>54</i>
<i>Bild 17: Ovar Katze, Ovarrinde, Goldner-Färbung.....</i>	<i>55</i>
<i>Bild 18: Ovar Katze, Ovarrinde mit Primordialfollikel, PAS-Färbung</i>	<i>55</i>
<i>Bild 19: Ovar Katze, Primär- und Primordialfollikel, PAS-Färbung.....</i>	<i>57</i>
<i>Bild 20: Ovar Katze, Primär- und Sekundärfollikel, Alzianblau pH 2,5.....</i>	<i>57</i>
<i>Bild 21: Ovar Katze, Primär- und Primordialfollikel, van Gieson-Resorcinfuchsin- Färbung.....</i>	<i>57</i>
<i>Bild 22: Ovar Katze, Primär- und Primordialfollikel, Goldner-Färbung.....</i>	<i>57</i>
<i>Bild 23: Ovar Katze, Sekundärfollikel, Alzianblau pH 1.....</i>	<i>59</i>
<i>Bild 24: Ovar Katze, Sekundärfollikel, PAS-Färbung</i>	<i>59</i>
<i>Bild 25: Ovar Katze, früher Sekundärfollikel, Goldner-Färbung</i>	<i>59</i>
<i>Bild 26: Ovar Katze, Sekundärfollikel, HE-Färbung.....</i>	<i>59</i>
<i>Bild 27: Ovar Katze, Tertiärfollikel, Goldner-Färbung.....</i>	<i>61</i>
<i>Bild 28: Ovar Katze, Sekundärfollikel Übergang zum Tertiärfollikel, Alzianblau pH 2,5</i>	<i>61</i>
<i>Bild 29: Ovar Katze, früher Tertiärfollikel, PAS-Färbung nach Amylase- Vorbehandlung.....</i>	<i>61</i>
<i>Bild 30: Ovar Katze, Tertiärfollikel, Alzianblau pH 1</i>	<i>61</i>

<i>Bild 31: Ovar Katze, Follikelwand eines Tertiärfollikels, Goldner-Färbung.....</i>	<i>62</i>
<i>Bild 32: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PAS-Färbung.....</i>	<i>62</i>
<i>Bild 33: Ovar Katze, polyoozytärer Tertiärfollikel, HE-Färbung.....</i>	<i>63</i>
<i>Bild 34: Ovar Katze, polyoozytärer Tertiärfollikel, van Gieson-Resorcinfuchsin-Färbung.....</i>	<i>63</i>
<i>Bild 35: Ovar Katze, Markbereich, PAS-Färbung</i>	<i>65</i>
<i>Bild 36: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PAS-Färbung.....</i>	<i>65</i>
<i>Bild 37: Ovar Katze, atretischer Tertiärfollikel, PAS-Färbung</i>	<i>65</i>
<i>Bild 38: Ovar Katze, atretischer Tertiärfollikel, Alzianblau pH 2,5</i>	<i>65</i>
<i>Bild 39: Ovar Katze, atretischer Primärfollikel, Goldner-Färbung.....</i>	<i>66</i>
<i>Bild 40: Ovar Katze, atretischer Follikel, PAS-Färbung</i>	<i>66</i>
<i>Bild 41: Ovar Katze, Ovarrinde, Con A.....</i>	<i>69</i>
<i>Bild 42: Ovar Katze, polyoozytärer Tertiärfollikel, Con A</i>	<i>70</i>
<i>Bild 43: Ovar Katze, Rete, Con A</i>	<i>70</i>
<i>Bild 44: Ovar Katze, Gelbkörper, Con A.....</i>	<i>71</i>
<i>Bild 45: Ovar Katze, Thekadrüse, Con A.....</i>	<i>71</i>
<i>Bild 46: Ovar Katze, Sekundärfollikel, WGA</i>	<i>72</i>
<i>Bild 47: Ovar Katze, Thekadrüse, WGA</i>	<i>73</i>
<i>Bild 48: Ovar Katze, Tertiärfollikel, WGA.....</i>	<i>73</i>
<i>Bild 49: Ovar Katze, Ovarrinde, WGAs.....</i>	<i>74</i>
<i>Bild 50: Ovar Katze, Sekundärfollikel, WGAs.....</i>	<i>75</i>
<i>Bild 51: Ovar Katze, Primordialfollikel, PSA</i>	<i>76</i>
<i>Bild 52: Ovar Katze, Ovarrinde, PSA.....</i>	<i>77</i>
<i>Bild 53: Ovar Katze, Gelbkörper, PSA</i>	<i>77</i>
<i>Bild 54: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PSA.....</i>	<i>78</i>
<i>Bild 55: Ovar Katze, Ovarrinde, PHAE</i>	<i>79</i>
<i>Bild 56: Ovar Katze, Tertiärfollikel, PHAE</i>	<i>80</i>
<i>Bild 57: Ovar Katze, atretische Follikel, PHAE</i>	<i>80</i>
<i>Bild 58: Ovar Katze, Wand eines degenerierenden Follikels, VAA.....</i>	<i>81</i>
<i>Bild 59: Ovar Katze, Ovarrinde, SNA</i>	<i>82</i>
<i>Bild 60: Ovar Katze, Übersicht, SNA</i>	<i>83</i>
<i>Bild 61: Ovar Katze, Tertiärfollikel, SNA</i>	<i>83</i>
<i>Bild 62: Ovar Katze, Ovarrinde, SNA</i>	<i>84</i>
<i>Bild 63: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen</i>	<i>87</i>
<i>Bild 64: Ovar Katze, Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen</i>	<i>87</i>
<i>Bild 65: Ovar Katze, intraovarielles Rete, immunhistochemischer Nachweis von</i>	

<i>Zytokeratinen</i>	<i>87</i>
<i>Bild 66: Ovar Katze, atretischer Primär-/Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen.....</i>	<i>87</i>
<i>Bild 67: Ovar Katze, Rinde, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....</i>	<i>90</i>
<i>Bild 68: Ovar Katze, polyoozytärer Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin</i>	<i>90</i>
<i>Bild 69: Ovar Katze, Tertiärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin</i>	<i>90</i>
<i>Bild 70: Ovar Katze, Thekadrüse, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin....</i>	<i>90</i>
<i>Bild 71: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Laminin</i>	<i>92</i>
<i>Bild 72: Ovar Katze, Tertiärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Laminin .</i>	<i>92</i>
<i>Bild 73: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Laminin</i>	<i>93</i>
<i>Bild 74: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....</i>	<i>93</i>
<i>Bild 75: Ovar Katze, Thekadrüsen, immunhistochemischer Nachweis von Laminin...</i>	<i>93</i>
<i>Bild 76: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....</i>	<i>93</i>
<i>Bild 77: Ovar Katze, intraovarielles Rete, immunhistochemischer Nachweis von Desmin.....</i>	<i>95</i>
<i>Bild 78: Ovar Katze, Gefäße, immunhistochemischer Nachweis von Desmin</i>	<i>95</i>
<i>Bild 79: Ovar Katze, Ovarmark, immunhistochemischer Nachweis von Desmin</i>	<i>96</i>
<i>Bild 80: Ovar Katze, polyoozytärer Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Synemin</i>	<i>98</i>
<i>Bild 81: Ovar Katze, Rinde, immunhistochemischer Nachweis von Synemin</i>	<i>98</i>
<i>Bild 82: Ovar Katze, Tertiärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Synemin .</i>	<i>99</i>
<i>Bild 83: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin</i>	<i>101</i>
<i>Bild 84: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....</i>	<i>101</i>
<i>Bild 85: Ovar Katze, Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin</i>	<i>102</i>
<i>Bild 86: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin</i>	<i>102</i>
<i>Bild 87: Ovar Katze, Thekadrüse, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin....</i>	<i>102</i>
<i>Bild 88: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin</i>	<i>102</i>
<i>Bild 89: Ovar Katze, Primär- Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von SMA.....</i>	<i>105</i>
<i>Bild 90: Ovar Katze, polyoozytärer Follikel, immunhistochemischer Nachweis von SMA.....</i>	<i>105</i>

Bild 91: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von SMA.....	105
Bild 92: Ovar Katze, atretischer Follikel, immunhistochemischer Nachweis von SMA.....	105
Bild 93: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von SMA.....	106
Bild 94: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von SMA	106
Bild 95: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von S100.....	109
Bild 96: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von S100.	109
Bild 97: Ovar Katze, Thekadrüse, immunhistochemischer Nachweis von S100.....	109
Bild 98: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von S100.....	109
Bild 99: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von S100	110
Bild 100: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von S100.....	110
Bild 101: Ovar Katze, Primordialfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	112
Bild 102: Ovar Katze, Primär-/ Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	112
Bild 103: Ovar Katze, Sekundärfollikel, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	113
Bild 104: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	113
Bild 105: Ovar Katze, Thekadrüsen, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	113
Bild 106: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	113
Bild 107: Ovar Katze, Tertiärfollikelwand, immunhistochemischer Nachweis des Progesteron-Rezeptors	116
Bild 108: Ovar Katze, Gelbkörper, immunhistochemischer Nachweis des Progesteron-Rezeptors	116
Bild 109: Ovar Katze, Thekadrüsen, immunhistochemischer Nachweis des Progesteron-Rezeptors	116
Bild 110: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis des Progesteron-Rezeptors	116
Bild 111: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von ERα.....	118
Bild 112: Ovar Katze, Rete ovarii, immunhistochemischer Nachweis von ERα.....	118
Bild 113: Ovar Katze, Ovarrinde, immunhistochemischer Nachweis von ERα.....	119
Bild 114: Ovar Katze, Primordialfollikel in der Ovarrinde, EM.....	122
Bild 115: Ovar Katze, Primordial- und beginnender Primärfollikel, EM	123

<i>Bild 116: Ovar Katze, Primordialfollikelwand, EM.....</i>	<i>124</i>
<i>Bild 117: Ovar Katze, Primordialfollikel, EM</i>	<i>125</i>
<i>Bild 118: Ovar Katze, Primordialfollikel, Übergang zum Primärfollikel, EM.....</i>	<i>126</i>
<i>Bild 119: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 118, EM.....</i>	<i>127</i>
<i>Bild 120: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 118, EM.....</i>	<i>128</i>
<i>Bild 121: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 118, EM.....</i>	<i>129</i>
<i>Bild 122: Ovar Katze, Follikelwand eines antralen Follikels, EM</i>	<i>131</i>
<i>Bild 123: Ovar Katze, Granulosazellschicht eines antralen Follikels, EM</i>	<i>132</i>
<i>Bild 124: Ovar Katze, Follikelwand, EM.....</i>	<i>133</i>
<i>Bild 125: Ovar Katze, Follikelepithel, EM.....</i>	<i>134</i>
<i>Bild 126: Ovar Katze, Metaphase der Mitose einer Follikelepithelzelle, EM.....</i>	<i>135</i>
<i>Bild 127: Ovar Katze, Vergrößerung aus Bild 117, EM.....</i>	<i>136</i>
<i>Bild 128: Ovar Katze, Keimdrüsenepithel, EM.....</i>	<i>138</i>
<i>Bild 129: Ovar Katze, Thekadrüse, EM.....</i>	<i>140</i>
<i>Bild 130: Ovar Katze, Thekadrüsen, EM.....</i>	<i>141</i>
<i>Bild 131: Ovar Katze, differenzierte Thekazellen, EM.....</i>	<i>142</i>
<i>Bild 132: Ovar Katze, perinukleärer Bereich einer Thekazelle, EM</i>	<i>143</i>
<i>Bild 133: Ovar Katze, Kapillaren im Ovarstroma, EM.....</i>	<i>144</i>

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Lektine, modifiziert nach Goldstein & Poretz 1986; Wu et al. 2009; Gabius et al. 2009; Lohr et al. 2010; Gabius et al. 2011; Rodler & Sinowatz 2011; Roth 2011</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2: Intermediärfilamentklassen modifiziert nach Iwatsuki & Suda 2010; Hees & Sinowatz 2012</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 3: verwendete FITC-markierte Lektine.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 4: verwendete biotinylierte Lektine</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 5: verwendete Antikörper.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 6: Konventionelle und substrathistochemische Färbungen am Ovar der Katze.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 7: Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 8: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 9: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis von Laminin.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von Desmin</i>	<i>94</i>
<i>Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von Synemin.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabelle 14: Immunhistochemischer Nachweis von SMA.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabelle 15: Immunhistochemischer Nachweis von S100.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabelle 16: Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabelle 17: Immunhistochemischer Nachweis von Progesteron-Rezeptoren</i>	<i>114</i>
<i>Tabelle 18: Immunhistochemischer Nachweis von ERα.....</i>	<i>117</i>

XI. ANHANG

1. Methodik - Lichtmikroskopie

1.1. Fixierungslösungen

Bouin

- 750ml gesättigte wässrige Pikrinsäure (Firma Merck, Darmstadt)
- 250ml Formaldehyd 37 % (Firma Merck, Darmstadt)
- 50ml Eisessig (Firma Merck, Darmstadt)

Formalin

- Formaldehyd 37 % im Verhältnis 1:10 mit PBS Puffer verdünnen

1.2. Puffer

PBS Puffer pH 7,4

- 42,50g NaCl (Natriumchlorid) (Firma Merck, Darmstadt)
- 6,35g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Di-Na-hydrogenphosphat-dihydrat) (Firma Merck, Darmstadt)
- 1,95g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Na-dihydrogenphosphat-1-hydrat) (Firma Merck, Darmstadt)
- Aqua dest. ad 5l

Citratpuffer pH 6,0

Stammlösung A:

- 21,01g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ (Citrat) (Firma Merck, Darmstadt)
- Aqua dest. ad 1l

Stammlösung B:

- 29,42g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Natriumcitrat) (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Aqua dest. ad 1l

Gebrauchslösung:

- 9ml Lösung A
- 41ml Lösung B
- Aqua dest. ad 500ml

1.3. Färbelösungen

1.3.1. H.E.

Hämalaun

- 2,0g Hämatoxylin
- 0,4g NaJO₃ (Natriumjodat)
- 100g AlK(SO₄)x12H₂O (Aluminiumkaliumsulfat)
- 100g C₂H₃Cl₃O₂ (Chloralhydrat)
- 2,0g kristalline Zitronensäure
- Aqua dest. ad 2l

Eosin

Stammlösung:

- 2,0g Eosin
- 198ml Aqua dest.
- einige Tropfen Formol (zur Haltbarkeitsteigerung)

Gebrauchslösung:

- 60ml Stammlösung
- 8 Tropfen Eisessig
- 600ml Aqua dest.

1.3.2. PAS

Schiff'sches Reagenz (Firma Roth, Karlsruhe)

0,5 % wässrige Lösung von Perjodsäure

- 0,5g H₅IO₆ (Perjodsäure) (Firma Merck, Darmstadt)
- 100ml Aqua dest.

SO₂ (Schwefeldioxid) -Wasser

- 200ml Leitungswasser
- 10ml Na₂S₂O₅ (Natrium-Pyrosulfit)-Lösung
- 10ml n-HCl (900ml Aqua dest. und 100ml HCl konzentriert)

Essigsäure-Pyridin-Lösung

- 16ml C₄H₆O₃ (Essigsäureanhydrid)
- 24ml C₅H₅N (Pyridin)

0,1 n-Salzsäure-Methanol (absolut)-Lösung:

- n-HCl

- CH_4O (Methanol) im Verhältnis 1:10

0,5% α -Amylase

- α -Amylase (Firma Merck, Darmstadt) 10mg
- Aqua dest. 2ml

1.3.3. Goldner**Eisenhämatoxylin nach Weigert**

Lösung A:

- 1,0g Hämatoxylin
- 100ml 96% Alkohol

Lösung B:

- 2,48g FeCl_3 (Eisen(III)chlorid)
- 100ml Aqua dest.
- 1ml konzentrierte HCl 37 % (Salzsäure)

Gebrauchslösung:

- Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1

Azophloxin

- 0,5g Azophloxin
- 100ml Aqua dest.
- 0,2ml Eisessig

Phosphormolybdänsäure-Orange

- 3-5g Phosphormolybdänsäure oder Phosphorwolframsäure
- 100ml Aqua dest.
- 2,0g Orange G

Lichtgrün

- 0,1– 0,2g Lichtgrün
- 100ml Aqua dest.

Essigsäure 1 % / 3 %

- 10/30ml Eisessig
- 1l Aqua dest.

1.3.4. Alzianblau**Alzianblau pH 1,0**

- 1g Alcianblau 8 GX (Firma Merck, Darmstadt)
- 100ml 0,1N-HCl

- pH 1,0 einstellen
- Thymolkristall

Alcianblau pH 2,5

- 1g Alcianblau 8 GX
- 100ml 3 % Essigsäure
- pH 2,5 einstellen
- Thymolkristall

Kernechtrot:

- Aluminiumsulfat (Firma Merck, Darmstadt) 5g
- In 100ml Aqua dest. lösen und Lösung erhitzen
- 0,1g Kernechtrot (Firma Merck, Darmstadt)

1.3.5. Glykohistochemie

FITC markierte Lektine (Firma Vector, Burlingame, USA)

MAA I, SNA, VAA (Lehrstuhl für physiologische Chemie,
Veterinärwissenschaftliches Department, LMU München)

VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Firma
Vector, Burlingame, USA)

Protein Block Serum-Free (Firma Dako, Hamburg)

Streptavidin-FITC (Firma Dako, Hamburg)

1.3.6. Immunhistochemie

DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Hydrogenperoxid-

Lösung

Stammlösung:

- 5ml PBS-Puffer
- 15µl 30% H₂O₂

Gebrauchslösung:

- 6 DAB-Tabletten (Firma Dako, Hamburg)
- 60ml Aqua dest. auflösen
- 400µl Stammlösung

Antibody-Diluent (Firma Dako, Hamburg)

Protein Block Serum-Free (Firma Dako, Hamburg)

VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Firma Vector, Burlingame, USA)

Rabbit anti-mouse-IgG-FITC (Firma Dako, Hamburg)

Fluorescein Anti-Rabbit IgG (vom Schwein) (Firma Vector, Burlingame, USA)

2. Methodik - Elektronenmikroskopie

2.1. Fixierungslösung nach Karnovsky

10% Paraformaldehyd-Lösung:

- 10g Paraformaldehyd (Firma Merck, Darmstadt)
- 100ml Aqua dest.
- 1-2 Tropfen 1N NaOH (Firma Carl Roth, Karlsruhe)

Karnovsky-Stammlösung:

- 20ml Paraformaldehyd-Lösung (10%)
- 50ml 0,2M-Cacodylat-Puffer
- 0,05g CaCl_2 (Kalziumchlorid) (Firma Merck, Darmstadt)

Karnovsky-Gebrauchslösung:

- 10ml Stammlösung
- 1,37ml 25% Glutaraldehyd (Firma Polysciences, Warrington, USA)

2.2. Cacodylat-Puffer

Stammlösung:

- 8,56g $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Natriumcacodylat)
(Firma Polysciences, Warrington, USA)
- 200ml Aqua dest.

0,2M-Lösung:

- 50ml Stammlösung
- tropfenweise 0,2M HCl bis pH 7,2 (Firma Merck, Darmstadt)
- Aqua dest. ad 100ml

0,1M-Lösung:

- 50ml 0,2M-Lösung
- 50ml Aqua dest.

2.3. Lösungen

Kontrastierungslösung

2% OsO₄ (Osmiumtetroxid)-Lösung:

- 2ml 4% OsO₄ (Firma Polysciences, Warrington, USA)
- 2ml 0,1M Cacodylat-Puffer

3% C₆FeK₄N₆ (Kaliumferrocyanid)-Lösung:

- 0,3g C₆FeK₄N₆ (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 0,1M-Cacodylat-Puffer ad 10ml

Osmiumtetroxid(1%)-Kaliumferrocyanid(1,5%) in 0,1M-Cacodylatpuffer:

- 4ml 2% OsO₄-Lösung
- 4ml 3% C₆FeK₄N₆-Lösung

Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (pH ~ 12)

- 0,266g Pb(NO₃)₂ (Bleinitrat)
(Firma Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 0,352g Na₃(C₆H₅O₇)x2H₂O (Natriumcitrat)
(Firma Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 6ml Aqua dest.
- ca. 1,6ml 1N NaOH für pH-Wert

Uranylacetat

- Uranylacetat (Firma Scientific LTD, Essex, UK)
- Aqua dest. bis zur gesättigten Lösung

2.4. Methylenblau nach Richardson

Stammlösung:

- 1% Methylenblau (Firma Merck, Darmstadt)
- 1% Borax Na₂B₄O₇x10H₂O (Natriumtetraboratdecahydrat)
(Firma Serva, Heidelberg)
- im Verhältnis 1:1

Gebrauchslösung:

- 1% Azur II (Firma Waldeck, Münster)
- Stammlösung
- im Verhältnis 1:1

2.5. Polyembed-Einbettung

- 20ml Poly/Bed® 812 (Firma Polysciences, Warrington, USA)
- 16ml DDSA (Firma Polysciences, Warrington, USA)
- 10ml NMA (Firma Polysciences, Warrington, USA)
- 1,4ml BDMA (Firma Polysciences, Warrington, USA)

XII. DANKSAGUNG

Ein ganz besonderer Dank gilt vorab meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Möglichkeit dieser Dissertation, die freundliche und geduldige Betreuung und jederzeit schnelle Antwort auf alle Fragen und E-Mails. Ebenso für die fachliche Betreuung, die Anfertigung der Aufnahmen am konfokalen Mikroskop und am Elektronenmikroskop.

Auch allen Mitarbeitern des Instituts für Histologie, die mich bei den praktischen Arbeiten unterstützt haben, wie Herrn Gök, Frau Rußmeier und Frau Setteles möchte ich herzlich danken sowie Frau Kazior für die Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Scholz, die mit großem Engagement die EM-Proben bearbeitet hat und auch bei vielen anderen Problemen eine freundliche Ansprechpartnerin für die Doktoranden war.

Ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit hat auch mein Lebensgefährte Michael Rauch beigetragen, der mich bei allen computertechnischen und formatierungstechnischen Fragen unterstützt hat und mir eine große Hilfe bei der Einarbeitung in Excel und Photoshop war und auch Verständnis für die vielen mit dieser Arbeit verbrachten Stunden hatte.

Vielen Dank auch an meine Eltern, alle Freunde, Familienangehörige und Kollegen, die mich immer wieder motiviert haben diese Arbeit fertigzustellen und mich teilweise dabei auch tatkräftig unterstützt haben.

Zum Schluss auch an Helga, Franz und Michael Rauch vielen Dank für die Unterstützung beim Druck dieser Arbeit.